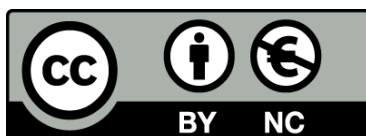




UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

## Nuevos factores del hospedador en la fisiopatología y la respuesta al tratamiento antiviral de la infección por el virus de la hepatitis C

Carlos Fernández Carrillo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**

# Nuevos factores del hospedador en la fisiopatología y la respuesta al tratamiento antiviral de la infección por el virus de la hepatitis C

Tesis presentada por *CARLOS FERNÁNDEZ CARRILLO* para  
optar al Título de Doctor en Medicina.

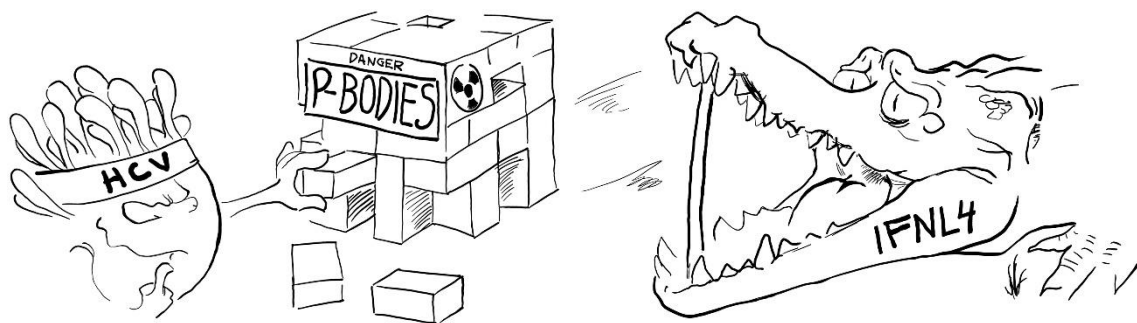
---

↘ Laboratorio de Hepatitis Víricas, Servicio de Hepatología,  
Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd.

Bajo la dirección de:

**Dra. Sofía Pérez del Pulgar Gallart**

**Dra. Juana Díez Antón**



## Informe de las directoras de tesis

**Sofía Pérez del Pulgar Gallart**, Doctora en Ciencias Químicas e Investigadora Senior en el Laboratorio de Hepatitis Víricas, IDIBAPS, CIBERehd, del Hospital Clínic de Barcelona;

**Juana Díez Antón**, Doctora en Biología y Profesora Titular en la Universidad Pompeu Fabra, directora del grupo de Virología Molecular (Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud);

### CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral “NUEVOS FACTORES DEL HOSPEDADOR EN LA FISIOPATOLOGÍA Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C”, presentada por Carlos Fernández Carrillo para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo su dirección y cumple todos los requisitos necesarios para ser defendida ante el tribunal de evaluación correspondiente.

Dra. Sofía Pérez del Pulgar Gallart



Dra. Juana Díez Antón



Directoras de la tesis.

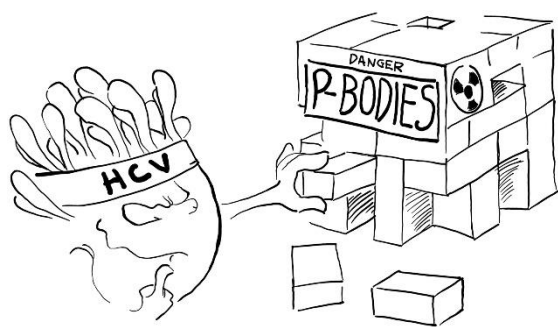
Barcelona, 2016





*“[...] don Quijote salió de la venta, informándose primero cuál era el más derecho camino para ir a Barcelona, sin tocar en Zaragoza [...].”*

*“Llegaron a su playa la víspera de San Juan en la noche, y abrazando Roque [Guinart] a don Quijote y a Sancho [...] vieron el mar, hasta entonces dellos no visto; parecióles espaciosísimo y largo, harto más que las lagunas de Ruidera, que en la Mancha habían visto [...].”*



## *Prólogo*

Estimado lector:

Me consta que, pese a las apariencias de este volumen, el autor no desea seguir engañándole ni una línea: él mismo reconoce que es más bien tontillo... Ya me lo explicó una vez. Es algo como el color de su pelo, de sus ojos o de su piel; es. No lo puede evitar. Peor aún, el pelo se puede teñir, para los ojos existen lentillas, y varios personajes famosos han demostrado que el color de la piel no es algo definitivo. En cambio, y como se dice por su tierra (Raticulín): “por sus actos les conoceréis”. Así, el que es tontín, es tontín, y ninguno de los perfumes, ropas o ungüentos con que se tape las vergüenzas pueden evitar que el mundo se dé cuenta. Los actos son los actos. Y es que la tontería es imposible de disimular por mucho tiempo, así que en su favor, no eludo el tema y lo saco nada más abrir la tesis (pero hablamos de tontería de la buena, que siempre gusta). Si el lector se pregunta qué tal se vive allí, de ese lado de la frontera de la tontuna, el autor le dirá que después de todo, no se está tan mal... de hecho, se ve que la última vez que se le ocurrió cruzarla en sentido contrario, no salió muy bien parado. “Virgencita, virgencita, que me quede como estoy”.

Como el autor es más bien tontuso, que lo sé yo, le gustan las cosas bien explicaditas y mascadas. “Para tontos”, que llaman. Por dicho motivo (que no razón), en esta tesis ha intentado exponer las ideas de la manera más didáctica y fácil posible. Si no lo logró, me dice que vayan por delante sus disculpas. Siempre tendrá la excusa de decir: “lo siento, es que soy más bien tontín”.

*El Tío Camuñas*



## *Agradecimientos*

Pocos (y sobre todo, pocas) me dijeron alguna vez que fuera yo agraciado. Seguramente, algún paciente me habrá llamado desgraciado de pensamiento durante una gastroscopia urgente. Sin embargo, es de buena nacencia ser agradecidos, así es que vaya mi agradecimiento a las siguientes personas:

A las directoras de la presente tesis, las Dras. Sofía Pérez del Pulgar Gallart y Juana Díez Antón, por sus muchas ideas e inestimable orientación, y por ser algo más que meras directoras. Con la Dra. Pérez del Pulgar tengo un agradecimiento especial por su gran accesibilidad, y le tenemos por derecho reservada en Ciudad Real la casa de su antepasado, Hernán Pérez del Pulgar. Al Dr. Xavier Forns Bernhardt le meto en el mismo saco que ambas, reiterando mi agradecimiento por su orientación, y por ser jefe y algo más que jefe.

Al Dr. José Luis Calleja Panero, por darme, junto con el Dr. Forns, la oportunidad de haber comenzado esta senda, que aún estamos pendientes de saber adónde me conducirá.

A mis padres, por permitirme comenzar en este tren que se llama Vida. Empecé muy pronto, prácticamente desde que nací. Y a mis hermanos, por inocularme el interés por la Ciencia y el amor por la Naturaleza desde poquito después.

A la Dra. Laura Mensa Garrigosa... Com puc sintetitzar tot el que vull dir? Gràcies per arrencar-me unes llàgrimes amb l'agraïment de la teva tesi. Amb això ja dic moltes coses que no es poden expressar amb paraules; millor doncs poques i ben dites.

A la Dra. Martina Gambato, compañera de cocinas y pitanzas, amiga, y sobre todo, buena gente. Autora incombustible de vespertinas e ingeniosas preguntas científicas.

A la Dra. Gemma Pérez Vilaró, inventora junto con el autor de un nuevo baile: el Pibodi, furor de los guiris el verano que viene. Constituyó un contrapunto organizado en la época en la que el cerebro no me daba más que para devanear, tribular y zascandilear (un saludo al Pep, al que, excepto personalmente, conozco ya de todas las maneras indirectas imaginables). Vaya

también mi agradecimiento a los Dres. Jennifer Jungfleisch y Bernat Blasco, miembros del mismo equipo, que tan buen ambiente constituyeron.

A todos los compañeros del grupo de hepatitis víricas: Pre-Dra. y detallista Noelia Caro (¡Lo conseguirás!), Dra. Mairene Coto, Dr. Georgios Koutsoudakis, Técnico Patricia González, Dra. María Londoño, Dra. Zoe Mariño y Dra. Sabela Lens. Todos han tenido un papel importante en el presente trabajo.

Al Dr. Xavier Sanjuán, bonachón donde los haya, por sus virtualmente infinitos recursos y conocimientos sobre microscopía, que lograron despejar todo obstáculo técnico antes prácticamente de que surgiera.

A los compañeros del laboratorio de hemodinámica portal, que constituyeron siempre un reservorio de cariño, honestidad, risa y buen rollo en general. Y lo siguen siendo.

A mis amigos Zulema Latasa de Aranibar Moreno, Samuel Lorenzo Velasco, y cía., por el estupendo apoyo moral en mis años barceloneses.

A mis amigos de toda la vida de Ciudad Real. Los de siempre. Gañanes anónimos de pensamiento, palabra, obra, y sobre todo, omisión. Y “raritos”... Eso sí, muy majos.

A Aníbal, mi compañero de piso, gran consumidor de café (so pena de trastabillones y tumbos matutinos). Gracias por su buena compañía, por sus consejos y por sus despistes.

A la Dra. Nicole Marie Arias Báez, por compartir una historia que podría haber inspirado a muchos artistas y conmovido a muchos espectadores. *May Nature be with thou.*

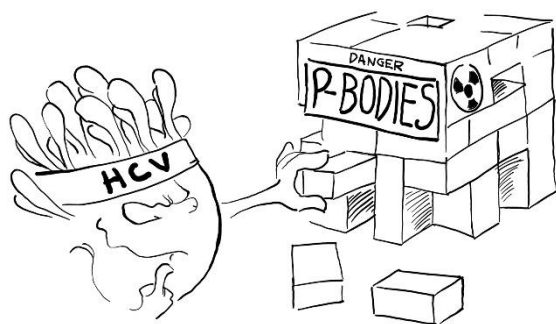
A Andrés Cabello Corona, por ser el único místico conocido que monta bares y fuma puritos.

A la Lda. Marina Vivó Aznar, por su de todo punto inconmensurable ayuda en este trabajo. Aunque salga en último lugar, su contribución ha influido en todos los aspectos de la tesis.

En realidad, siempre hay algún agradecimiento, incluso para con los que se tienen desagradecimientos. De hecho, agradezco su influencia tácita o explícita sobre mi trabajo a todas las personas que de algún modo han formado

parte de mi vida durante este tiempo. Y son muchas. La compleja constelación de elementos que componen a los seres humanos y sus relaciones sociales no se puede abarcar en unas pobres páginas.



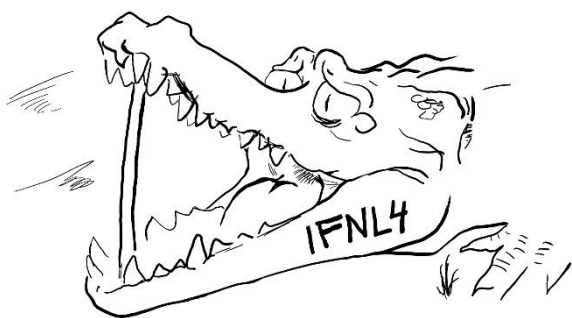


## Contenido

Lista de Abreviaturas.....	17
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
1.1. Epidemiología del virus de la hepatitis C: magnitud del problema.....	24
1.2. Taxonomía y estructura del VHC.....	29
1.3. Evolución genética del VHC a lo largo de la Historia: genotipos y subtipos. Distribución mundial de los mismos.....	35
1.4. Historia natural de la infección por VHC.....	39
1.5. Particularidades de la infección por VHC en el trasplante hepático.....	42
1.6. Visión general del ciclo del VHC, incluyendo sus modelos de estudio.....	44
1.6.1. Entrada y desencapsidación del VHC.....	46
1.6.2. Traducción y procesado de la poliproteína. Replicación del VHC.....	48
1.6.3. Ensamblaje y secreción.....	49
1.7. <i>P-bodies</i> y gránulos de estrés. Concepto y papel en el ciclo del VHC.....	52
1.7.1. Concepto y función de los <i>P-bodies</i> .....	53
1.7.2. Concepto y función de los gránulos de estrés.....	54
1.7.3. Interacciones entre <i>P-bodies</i> y gránulos de estrés.....	55
1.7.4. Cómo el VHC “juega” con <i>P-bodies</i> y gránulos de estrés sin quemarse.....	55
1.8. El interferón-lambda 4.....	60
1.8.1. Concepto de interferón.....	60
1.8.2. Visión global resumida de la inmunidad innata contra el VHC. Secreción de los interferones.....	61

1.8.3.	Los polimorfismos del interferón-lambda 3 (IL-28B) y sus implicaciones.	62
1.8.4.	El interferón-lambda 4: la pieza que faltaba.....	64
1.8.5.	El interferón-lambda 4 desde una perspectiva evolutiva.....	67
1.8.6.	El caso específico del TH.....	69
1.9.	Los rápidos avances en el tratamiento del VHC.....	72
1.9.1.	Terapias basadas en IFN.....	73
1.9.2.	Terapias libres de IFN.....	73
1.9.3.	Otras dianas terapéuticas.....	74
1.9	(extra). Breve revisión anatomohistológica del hígado.....	76
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>79</b>
<b>3.</b>	<b>RESUMEN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
3.1.	TRABAJO 1: Estudio de los <i>P-bodies</i> en hígados de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C.....	84
3.1.1.	Disminución específica de la abundancia de <i>P-bodies</i> en hígados de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C.....	85
3.1.2.	El efecto del virus de la hepatitis C sobre los <i>P-bodies</i> ocurre tanto en fase aguda como crónica, y revierte con la respuesta viral sostenida.....	85
3.1.3.	Los <i>P-bodies</i> de las células somáticas son más heterogéneos <i>in vivo</i> de lo descrito <i>in vitro</i> .....	86
3.1.4.	El análisis en 3 dimensiones de hepatocitos individuales corrobora la disminución de <i>P-bodies</i> observada a un nivel histológico global.....	86
3.2.	TRABAJO 2: Estudio de los polimorfismos del interferón-lambda 4 en pacientes trasplantados, tratados de recidiva post-trasplante del virus de la hepatitis C.....	87
3.2.1.	Distribución del genotipo de rs368234815 (IFNL4) en los receptores y sus donantes.....	87

3.2.2.	Asociación del polimorfismo rs368234815 (IFNL4) con la respuesta al tratamiento según donantes y receptores.....	88
3.2.3.	Utilidad del polimorfismo rs368234815 (IFNL4) para predecir la respuesta al tratamiento.....	88
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>117</b>
7.1.	Anexo I.....	118
7.1.1.	Material suplementario del artículo del Anexo I.....	125
7.2.	Anexo II.....	128
7.2.1.	Material suplementario del artículo del Anexo II.....	133
7.3.	Anexo III: Otros artículos relacionados con la tesis, publicados en el período de doctorado.....	134



## Lista de Abreviaturas

<b>A</b>	Adenosina
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADVP</b>	Abuso de drogas por vía parenteral
<b>ALT</b>	Alanino-aminotransferasa
<b>ARFP</b>	Proteína de marco de lectura alternativo (del Inglés: <i>Alternative Reading frame protein</i> )
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNb</b>	ARN bicatenario
<b>ANRm</b>	ARN mensajero
<b>AST</b>	Aspartato-Aminotransferasa
<b>BorderDV</b>	Virus de la “enfermedad límite” (del Inglés: <i>Border disease virus</i> )
<b>BPgV</b>	<i>Pegivirus</i> del murciélago (del Inglés: <i>Bat Pegivirus</i> )
<b>BVDV</b>	Virus de la diarrea bovina (del Inglés <i>Bovine diarrhea disease virus</i> )
<b>C</b>	Citosina
<b>CD81</b>	Clúster de diferenciación 81 (del inglés: <i>Cluster of differentiation 81</i> )
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CLDN1</b>	Claudina-1
<b>cPLA2</b>	Fosfolipasa A2 citosólica regulada por MAPK (del inglés: <i>MAPK (Mitogen-activated protein kinase)-regulated protein cytosolic phospholipase A2</i> )
<b>CypA</b>	Ciclofilina A
<b>DENV</b>	Virus del Dengue (del Inglés: <i>Dengue virus</i> )
<b>DGAT1</b>	Diacilglicerol O-acetiltransferasa (del inglés: <i>Diacylglycerol O-acetyltransferase 1</i> )
<b>E</b>	Proteínas estructurales del VHC
<b>EEUU</b>	Estados Unidos (de América)
<b>EPHA2</b>	Receptor 2 de efrina tipo A (del Inglés: <i>Ephrin type A receptor 2</i> )

<b>G</b>	Guanina
<b>GAG</b>	Glucosaminoglucanos
<b>GBD</b>	Carga Global de la Enfermedad (del Inglés: <i>Global burden of the disease</i> )
<b>GBV</b>	Virus G.B. (del Inglés: <i>G.B. virus</i> ; <i>N.b.</i> : G.B. son las iniciales de un cirujano estadounidense; J Exp Med 125, 673–688).
<b>GE</b>	Gránulos de estrés
<b>GL</b>	Gotas lipídicas
<b>GPVH</b>	Gradiente de presión venosa hepática
<b>HCF</b>	Hepatitis colestásica fibrosante
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad (del inglés: <i>High-density lipoprotein</i> )
<b>HGV</b>	Virus de la hepatitis G (del Inglés: <i>Hepatitis G virus</i> )
<b>HogCV</b>	Virus de la peste porcina clásica (del Inglés: <i>Hog cholera virus</i> : “Virus del cólera porcino”, nombre antiguo con el que se designaba la peste porcina clásica, actualmente: <i>classic swine fever</i> )
<b>HPgV</b>	<i>Pegivirus</i> humano (del Inglés: <i>Human Pegivirus</i> )
<b>HVR-1</b>	Región hipervariable-1 (del Inglés: <i>Hypervariable region-1</i> )
<b>IFN</b>	Interferón (proteína)
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferón-alfa (proteína)
<b>IFN-<math>\lambda</math></b>	Interferón-lambda (proteína)
<b>IFN-<math>\lambda</math>3</b>	Interferón-lambda 3 (proteína)
<b>IFN-<math>\lambda</math>4</b>	Interferón-lambda 4 (proteína)
<b>IFNL3</b>	Interferón- $\lambda$ 3 (gen)
<b>IFNL4</b>	Interferón- $\lambda$ 4 (gen)
<b>IFN-<math>\lambda</math>R1</b>	Cadena 1 del receptor de IFN- $\lambda$
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IL-10</b>	Interleuquina-10
<b>IL-10R<math>\beta</math></b>	Cadena 2 del receptor de IL-10
<b>IL-22</b>	Interleuquina-22
<b>IL-28A</b>	Interleuquina-28A
<b>IL-28B</b>	Interleuquina-28B

<b>IL-29</b>	Interleuquina-29
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estadística
<b>IP</b>	Inhibidor de la proteasa
<b>IP-10</b>	Proteína inducible por IFN- $\gamma$ 10 (del Inglés: <i>IFN-<math>\gamma</math>-inducible protein-10</i> )
<b>IRES</b>	Sitio de entrada interna al ribosoma (del Inglés: <i>Internal ribosome entry site</i> )
<b>IRF-3</b>	Factor regulador de interferón-3 (del inglés: <i>Interferon regulating factor-3</i> )
<b>IRF-9</b>	Factor regulador de interferón-9 (del inglés: <i>Interferon regulating factor-9</i> )
<b>ISGF-3</b>	Factor de gen estimulado por interferón-3 (del inglés: <i>Interferon-stimulated gene factor 3</i> )
<b>JEV</b>	Virus de la encefalitis japonesa (del Inglés: <i>Japanese encephalitis virus</i> )
<b>JFH-1</b>	Hepatitis fulminante japonesa 1 (del inglés: <i>Japanese fulminant hepatitis 1</i> )
<b>Kb</b>	Kilobase/s
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad (del inglés: <i>Low-density lipoprotein</i> )
<b>LDLR</b>	Receptor de LDL (del inglés: <i>LDL receptor</i> )
<b>MAVS</b>	Proteína mitocondrial de señalización antiviral (del inglés: <i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i> )
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad (del Inglés: <i>Major histocompatibility complex</i> )
<b>MSM</b>	Hombres que tienen sexo con hombres (del Inglés: <i>Men who have sex with men</i> )
<b>NE</b>	Proteínas no estructurales del VHC
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear- $\kappa$ B (del inglés: <i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i> )
<b>NK</b>	Células “asesinas naturales” o <i>natural killer</i>
<b>NPC1L1</b>	Receptor de colesterol tipo Niemann-Pick C1 1 (del inglés: <i>Niemann-Pick C1-like 1</i> )
<b>miARN</b>	MicroARN
<b>OCLDN</b>	Ocludina



<b>OMS</b>	Organización Mundial para la Salud
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto (del Inglés: <i>Open reading frame</i> )
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBMC</b>	Células monocíticas de sangre periférica (del Inglés: <i>Peripheral blood monocyte cells</i> )
<b>PEG-IFN</b>	PEG-Interferón o Interferón pegilado
<b>PKR</b>	Quinasa de proteína R (del inglés: <i>Protein kinase R</i> )
<b>PLV</b>	Partículas lipovirales
<b>RBV</b>	Ribavirina
<b>RdRp</b>	Polimerasa de ARN dependiente de ARN (del inglés: <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> )
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>RIG-I</b>	Gen del ácido retinoico inducible-I (del Inglés: <i>retinoic acid-inducible gene-I</i> )
<b>RVS</b>	Respuesta virológica sostenida
<b>SOF</b>	Sofosbuvir
<b>SPgV</b>	<i>Pegivirus</i> simiesco (del Inglés: <i>Simian Pegivirus</i> )
<b>SRB1</b>	Receptor <i>scavenger</i> de clase B-I (del inglés: <i>Scavenger receptor class B member 1</i> )
<b>STAT-1</b>	Transductores de señal y activadores de la transcripción (del inglés: <i>Signal transducers and activators of transcription</i> )
<b>SNP</b>	Polimorfismo/s de un solo nucleótido (del inglés: <i>Single-nucleotide polymorphism</i> )
<b>T</b>	Tirosina
<b>TARGA</b>	Terapia antirretroviral de gran actividad
<b>TBEV</b>	Virus de la encefalitis centroeuropea o transmitida por garrapatas (del Inglés: <i>Tick-borne encephalitis virus</i> )
<b>TH</b>	Trasplante hepático
<b>TLR</b>	Receptor/es <i>toll-like</i> o tipo <i>toll</i> (del Inglés: <i>Toll-like receptor/s</i> )
<b>TLR-3</b>	Receptor <i>toll-like-3</i> o tipo <i>toll-3</i> (del Inglés: <i>Toll-like receptor-3</i> )

<b>TRIF</b>	Adaptador contenedor de dominio TIR inductor de interferón- $\beta$ (del inglés: <i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-<math>\beta</math></i> )
<b>TRF1</b>	Receptor de transferrina 1
<b>UTR</b>	Región no traducida (del Inglés: <i>Untranslated region</i> )
<b>VEBO</b>	Virus del ébola
<b>VHB</b>	Virus de la hepatitis B
<b>VHC</b>	Virus de la hepatitis C
<b>VHCcc</b>	VHC derivado de cultivo celular
<b>VHCpp</b>	Pseudopartículas de VHC
<b>VHE</b>	Virus de la hepatitis E
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana adquirida
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad (del inglés: <i>Very-low-density lipoprotein</i> )
<b>WNV</b>	Virus del Nilo Occidental (del Inglés: <i>West Nile virus</i> )
<b>YFV</b>	Virus de la fiebre amarilla (del Inglés: <i>Yellow fever virus</i> )



# 1. INTRODUCCIÓN



### 1.1. Epidemiología del virus de la hepatitis C: magnitud del problema.

- La infección por VHC constituye una pandemia de 180 millones de infectados en el mundo con 350.000 muertes/año.
- El VHC es la principal causa de cirrosis y sus complicaciones.
- Las dos vías de contagio elementales son la sanguínea, y en menor medida, la sexual.
- Se prevé un pico de frecuencia de las complicaciones y consecuencias de la cirrosis para 2030 si no se logra modificar la historia natural de la infección.

Antes de entrar en profundidad en otros aspectos, conviene exponer el problema al que nos enfrentamos, que justifica sobradamente el objeto de esta tesis.

El virus de la hepatitis C (VHC) es claramente un problema de orden mundial. Diversos trabajos independientes y estudios provenientes de la Organización Mundial para la Salud (OMS) estiman en más de 180 millones las personas infectadas en todo el mundo, esto es, un 2,5-3% de la población de la Tierra <sup>[1, 2]</sup>. La auténtica prevalencia podría ser incluso mayor, debido a un posible sesgo de selección en algunos grupos de pacientes. Contrasta no obstante que también se le haya denominado la “pandemia silenciosa”, debido a su carácter crónico y subclínico, pasando frecuentemente desapercibida hasta que el paciente sufre cirrosis hepática. No en vano, el VHC es la principal causa de cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular (CHC) y trasplante hepático (TH) en Europa, las dos Américas, Japón y Australia <sup>[3]</sup>. Aunque la incidencia de infección por VHC parece estar reduciendo en los países desarrollados gracias a la prevención, se calcula que la morbilidad asociada a la infección crónica seguirá aumentando hasta el año 2030 aproximadamente, dado que irá creciendo el número de pacientes con enfermedad progresivamente más avanzada <sup>[4, 5]</sup>. Basándose en esta última sentencia, muchas de las proyecciones de los modelos epidemiológicos actuales tienen como límite el año 2030.

Desde el punto de vista de mortalidad, más de 180 millones de personas infectadas implican más de 350.000 muertes al año en el mundo <sup>[2]</sup>. De hecho, la mortalidad asociada al VHC ha aumentado en más del 50% durante las dos últimas décadas, y es importante reseñar que la infección por VHC aumenta sustancialmente la

mortalidad también cuando se consideran todas las causas de muerte agregadas, y no exclusivamente las causas en relación directa con el hígado <sup>[6, 7]</sup>.

La vía de contagio del VHC es fundamentalmente sanguínea, aunque también puede ser sexual. De estas dos vías fundamentales se deducen todos los factores de riesgo posibles para el contagio. El factor clásico ha venido siendo la transfusión de hemoderivados, sobre todo antes del descubrimiento del VHC en 1989, aunque este problema es prácticamente inexistente hoy en día en los países desarrollados gracias a las labores de prevención. En cualquier caso, no se puede despreciar en la actualidad el contagio nosocomial por otros procedimientos, incluso en dichos países desarrollados. De hecho, las unidades de hemodiálisis siguen siendo una fuente de contagio significativa <sup>[8-10]</sup>. Igualmente, uno de los factores de riesgo más importantes a nivel mundial es el abuso de drogas por vía parenteral (ADVP), que lejos de estar superado, es incluso un problema emergente en numerosos países <sup>[10]</sup>. En la misma línea, el abuso crónico de cocaína por vía intranasal está demostrado como factor de riesgo. Son también típicos factores la realización de tatuajes o colocación de *piercings* sin la debida profilaxis. En principio, la vía sexual (al igual que la transmisión vertical) no es muy eficiente para la transmisión del VHC, sin embargo, la promiscuidad aumenta el riesgo de manera notoria. En este sentido, son de destacar las relaciones sexuales homosexuales masculinas (MSM) sin protección, que en ocasiones pueden dar lugar a auténticos brotes agudos epidémicos a nivel local, siendo una fuente importante de incidencia en los países desarrollados. Las prácticas sexuales que se suelen dar en MSM, más traumáticas para las mucosas, tienen un papel añadido <sup>[10-12]</sup>. Finalmente, se han descrito otros factores de riesgo para contraer la infección, como el índice de pobreza, que no son sino elementos relacionados con una o las dos vías de contagio <sup>[13]</sup>.

No se puede olvidar que la infección por VHC puede conllevar la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH), especialmente en casos de ADVP y MSM, dado que ambos virus comparten vías de transmisión. En este aspecto, algún estudio ha situado la prevalencia de infección por VHC en torno al 55-60% de los pacientes con infección por VIH, siendo hoy en día la causa principal de mortalidad en dicha población en tratamiento con terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) <sup>[14-16]</sup>.

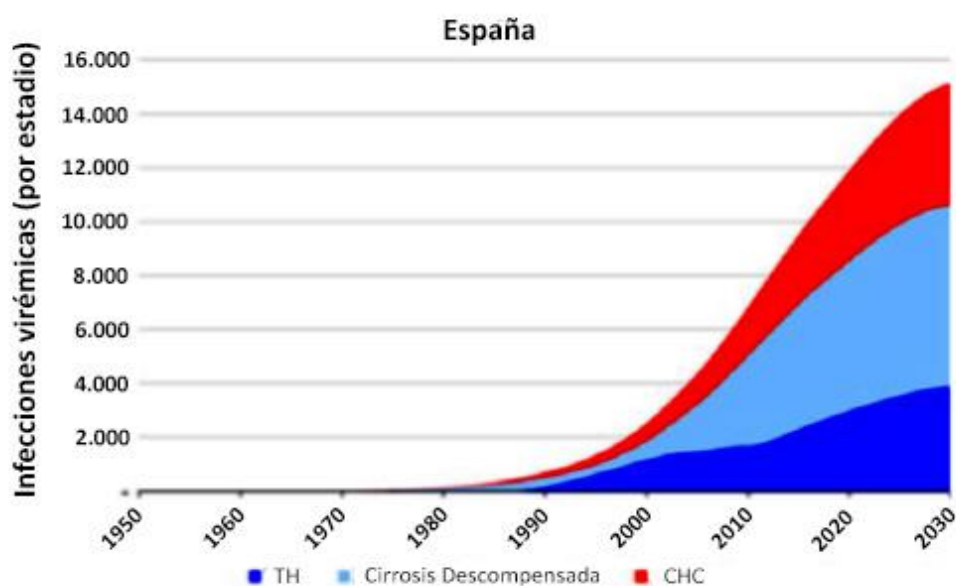
Como se ha demostrado más arriba, la infección por VHC constituye una auténtica lacra social y económica a nivel mundial, con las connotaciones psicológicas que supone para los pacientes el hecho de conocer que están infectados, independientemente del estado de la enfermedad en su caso.

En nuestro país, no hay hasta la fecha estudios nacionales amplios que permitan conocer con exactitud la prevalencia de la infección por VHC y sus consecuencias. Resulta llamativo al autor que la infección por VHC se haya incluido como enfermedad de declaración obligatoria a partir de 2013 <sup>[17]</sup>. La evidencia disponible comprende una serie de estudios internacionales y nacionales independientes, que junto con la información obtenida por el Instituto Nacional de Estadística (INE) y la reciente publicación del Libro Blanco de la Hepatología en España, permiten hacernos una idea aproximada de la realidad <sup>[17]</sup>. El estudio poblacional más reciente data de 2002 y se llevó a cabo en Cataluña, con una prevalencia del 2,6% para adultos de 25 años o más <sup>[18]</sup>. Si nos referimos a todo el territorio nacional, probablemente existan variaciones locorregionales, con menores frecuencias en las áreas más rurales, y mayores en las más urbanizadas, sin olvidar la influencia de la inmigración <sup>[19]</sup>. Así y todo, se estima que la prevalencia global en España es del 2,5% aproximadamente, lo cual nos sitúa en el grupo de países con alta prevalencia de VHC <sup>[17, 20]</sup>. En general, todos los estudios publicados hasta la fecha encuentran la mayor frecuencia de seropositividad en el grupo de pacientes mayores de 50 años, con un predominio de varones ([Figura 1](#)). Esta distribución sería concordante con la hipótesis de la transmisión nosocomial, que parece haber sido, junto con el ADVP, la principal vía de contagio en el último siglo. No obstante, podría haber factores inmunológicos que ayudasen a explicar esa diferencia entre sexos <sup>[21]</sup>.



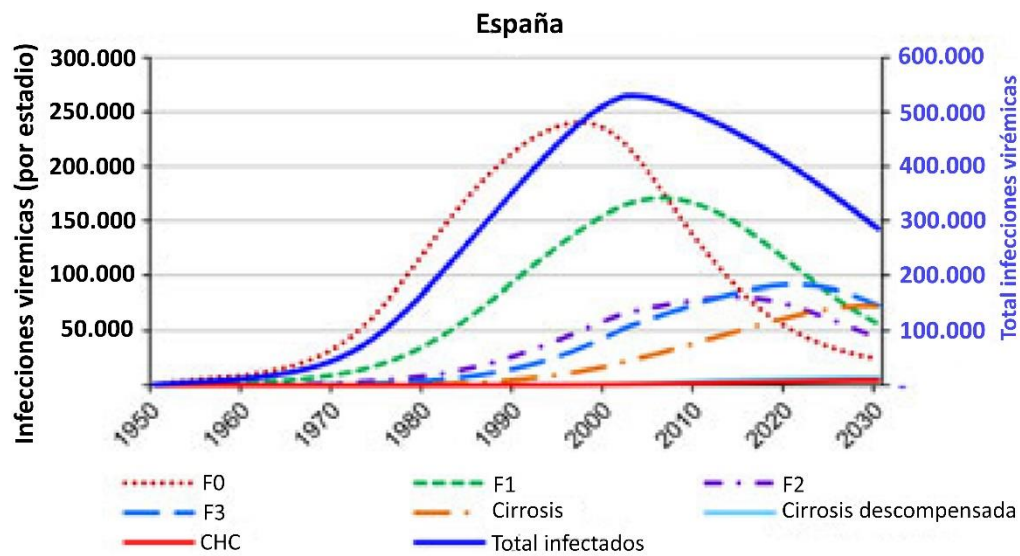
**Figura 1.** Distribución de la prevalencia de la infección por VHC por sexos en España (Fuente: modificado de Bruggmann et al., 2014).

Las proyecciones epidemiológicas en cuanto a la carga de la enfermedad producida por el VHC en España son similares a las de otros países de nuestro entorno. Se prevé un pico de frecuencia de las complicaciones y consecuencias de la cirrosis para 2030 (Figura 2 y Figura 3).



**Figura 2.** Evolución prevista del número de TH, casos de cirrosis descompensada y casos de CHC a lo largo del tiempo (Fuente: modificado de Razavi et al., 2014).





**Figura 3.** Evolución prevista del gravamen de la enfermedad por VHC a lo largo del tiempo (Fuente: modificado de Razavi et al., 2014).

### 1.2. Taxonomía y estructura del VHC.

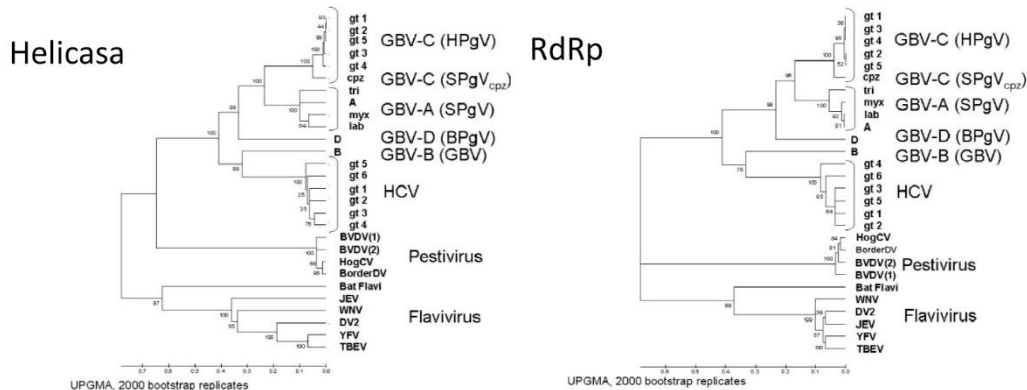
- El VHC es un *Flaviviridae* del género *Hepacivirus*.
- El genoma del VHC codifica para una poliproteína que se divide en 10 proteínas estructurales y no estructurales.
- Cada una de estas proteínas tiene funciones, generalmente múltiples, que intervienen en el ciclo del VHC.

Una vez conocidas las graves consecuencias del VHC, nos ocuparemos de su caracterización como virus, y en el apartado siguiente acabaremos de dar unas pinceladas a su epidemiología desde un punto de vista evolutivo.

Hasta 1989, la hepatitis C era conocida como “No A, No B”, una hepatitis huérfana que ya se sabía que podía transmitirse por transfusión o por ADVP, y que era capaz de cronificar, llevando a la cirrosis y sus complicaciones, incluso en chimpancés [22, 23]. En 1989, Choo *et al.* lograron identificar el VHC como agente causal en un artículo ya famoso, al utilizar una biblioteca de ADN complementario (ADNc) construida sobre el bacteriófago  $\lambda$ gt11, a partir del plasma de un chimpancé infectado. Dicha biblioteca se usó para cribar muestras de suero de pacientes infectados e identificar qué ácido nucleico hibridaba con dicho ADNc, descubriéndose una molécula de ARN que se relacionó con los géneros *Togaviridae* o *Flaviviridae* [8].

En la actualidad, el VHC está mucho mejor estudiado, y se sabe con seguridad que pertenece a la familia *Flaviviridae*, la cual se compone de 4 géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* y *Hepacivirus*. El género *Flavivirus* incluye el virus de la fiebre amarilla (YFV), el del dengue (DENV), el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV) y el de la encefalitis centroeuropea o transmitida por garrapatas (TBEV). El género *Pestivirus* por su parte, incluye el de la diarrea viral bovina (BVDV), el de la peste porcina clásica (HogCV) y el *border disease virus* (BorderDV). El género *Pegivirus* comprende la mayor parte de los virus conocidos comúnmente como GBV, es decir, GBV-A/SPgV (*Pegivirus* simiescos), GBV-C/HGV/HPgV (*Pegivirus* humano o de la hepatitis G) y GBV-D/BPgV (*Pegivirus* del murciélago). El VHC se incluiría en el género *Hepacivirus*, que también cuenta con el virus GB B (GBV-B), y otros virus animales

que se detallan a continuación (Figura 4) [24]. Se completará más adelante la caracterización evolutiva del VHC.



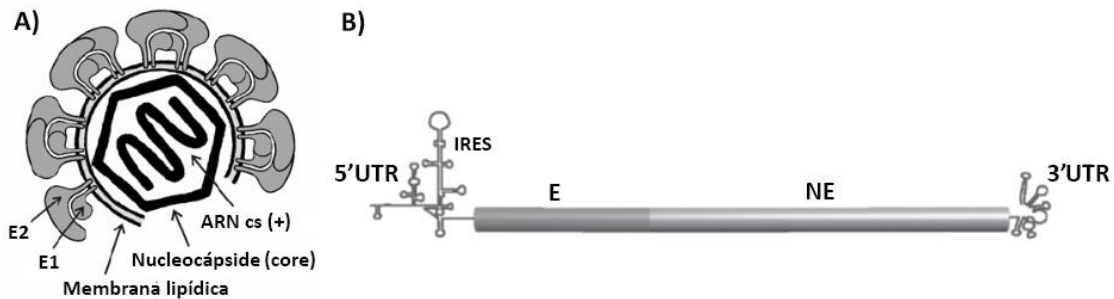
**Figura 4.** Árboles filogenéticos de los miembros de la familia *Flaviviridae* construidos a partir del alineamiento de secuencias de la helicasa y polimerasa de ARN (Fuente: modificado de Stapleton et al., 2011). La escala de distancias se mide en sustituciones de aminoácidos por posición. “RdRp”: Polimerasa de ARN; “cpz”: chimpanzee; “tri”: *Aotus trivirgatus*; “A”: *Aotus* spp.; “myx”: *Saguinus mystax*; “lab”: *Saguinus labiatus*; “gt”: *genotipo*; “Bat flavi”: *Flavivirus del murciélago*, tipo GB; “DV2”: *Virus del dengue de serotipo 2*.

Los miembros de la familia *Flaviviridae* tienen una estructura similar entre sí: desde fuera hacia dentro, poseen en primer lugar, una bicapa lipídica externa que literalmente han “robado” de la célula que les hospedó. Esta bicapa externa presenta una o varias proteínas ancladas, y envuelve a la nucleocápside. La nucleocápside es de naturaleza proteica sencilla, y a la vez guarda en su interior un genoma compuesto por una cadena positiva de ARN, es decir, por una hebra de ARN que se lee en sentido 5′ → 3′ (Figura 5a).

Como en todo ser capaz de replicarse, las claves más importantes se encuentran en el genoma (Figura 5b). El VHC presenta, de manera muy similar a los demás *Flaviviridae*, una cadena de ARN de  $9,6 \times 10^6$  nucleótidos (9,6 Kilobases -Kb-), con un único marco de lectura abierto (ORF). Esto quiere decir que la secuencia se puede traducir de un único modo posible, aunque existe una pequeña excepción con la denominada proteína de fusión, explicada más abajo. El genoma codifica para proteínas estructurales en la región N-terminal del ORF y para proteínas no estructurales en el resto del ORF. Las proteínas estructurales (E) ayudarán a formar la nucleocápside y envuelta externa, y las no estructurales (NE) tienen función enzimática, de cofactor o de poro/canal iónico. Custodiando ambos extremos del ORF se sitúan las regiones no traducidas (UTR) en 5′ y 3′ [25]. El papel de estas dos UTR no sólo es estructural, sino muy

# 1. Introducción

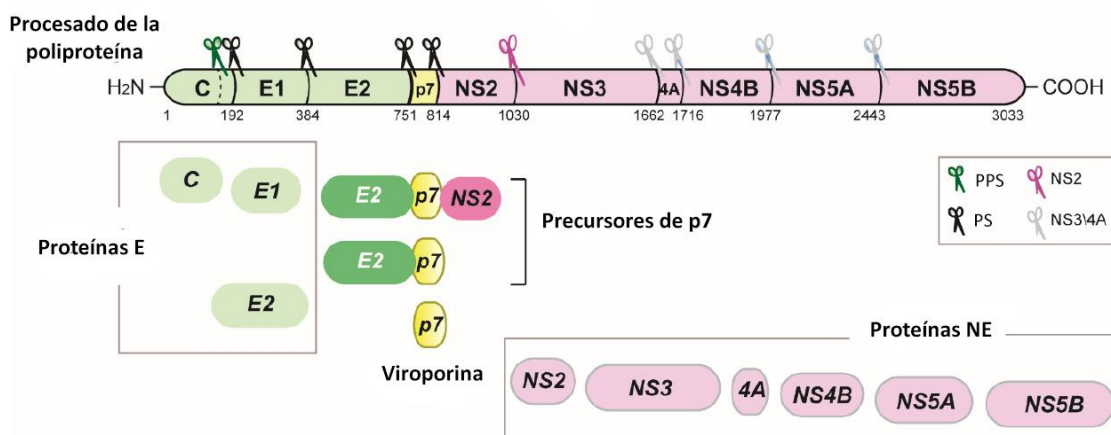
activo en la regulación de la traducción y replicación genómica, tal y como se describirá posteriormente.



**Figura 5.** Estructura externa (A) y genómica (B) del VHC (Fuente: modificado de Chevaliez et al., 2006). “ARN cs (+)”: ARN (+) de cadena sencilla; “E”: Proteínas estructurales; “NE”: Proteínas no estructurales; “IRES”: Internal ribosome entry site.

Las aproximadamente 9 Kb codificantes del genoma vírico (excluyendo pues las dos UTR, y con leves variaciones según el genotipo) codifican para una poliproteína de unos 3.000 aminoácidos (aa) que se traduce en el retículo endoplásmico (RE) rugoso. Una vez esta poliproteína se ha procesado por proteasas tanto víricas como de la célula hospedadora, se concreta en las 10 proteínas E y NE (Figura 6) [25, 26].

**Figura 6.** Poliproteína y precursores de p7 resultantes del genoma del VHC (Fuente: modificado de Madan et al., 2015).



Los números se refieren a las posiciones de aminoácidos del aislado JFH-1 (Número de adquisición en GenBank AB047639). “E”: Estructurales; “NE”: No Estructurales; “PPS”: Peptidasa de proteína señal; “PS”: Peptidasa señal (proteasas de la célula hospedadora).

Las proteínas E son core, E1 y E2, y se separan de la poliproteína a través de la peptidasa señal y peptidasa de péptido señal. La función primordial de core es formar parte de la nucleocápside, aunque se han descrito otras muchas funciones

complementarias por su interacción con otras proteínas y vías de señalización intracelular, que generalmente sirven para desviar la actividad del hospedador con el fin de favorecer el ciclo vírico. Por tanto, interviene en la formación y funcionamiento de la denominada red membranosa intracelular (conocida como *membranous web*) e influye en el ciclo celular del hepatocito. En estos procesos, no siempre el hospedador sale bien parado a largo plazo. Se ha descrito actividad oncogénica para ciertos patrones de nucleótidos en core del genotipo 1a [27]. De hecho, la relación de core con dicha red membranosa y las gotas lipídicas (GL) podría tener una influencia en el desarrollo de estatois, particularmente en pacientes infectados por el genotipo 3, un genotipo que además predispone a una mayor incidencia de CHC [28, 29].

Las proteínas E1 y E2, que son glucoproteínas, forman parte de la envuelta externa, situándose transmembrana en la bicapa lipídica, donde se unen covalentemente como heterodímero a través de dominios específicos (Figura 5a). Aquí, su función es capital, pues sirven para mediar la entrada y fusión del virus con la célula hospedadora. E2 contiene regiones hipervariables, con hasta un 80% de diferencia entre genotipos e incluso entre subtipos del VHC. Es de notar la región hipervariable-1 (HVR1), de 27 aa, que es un importante epítipo de neutralización vírica. Aunque HVR1 sea una región sometida a gran presión selectiva (de ahí su hipervariabilidad), también parece muy importante para el propio virus, pues sus propiedades fisicoquímicas permanecen razonablemente conservadas pese a su variedad aminoacídica.

Las proteínas NE son NS2, NS3, NS4A (también 4A, o incluso A), NS4B, NS5A y NS5B. NS2, de corta vida media, se une a NS3 y constituye una metaloproteasa dependiente de zinc, que paradójicamente, cataliza el clivaje entre ella misma y NS3 (autoproteasa), y posteriormente se degrada por el proteasoma. Este fenómeno en apariencia absurdo, parece ser importante para la formación del complejo de replicación del VHC (formado por NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). Hay otras funciones para NS2, como las efectuadas tras la unión a p7, que se describirán más abajo. NS3 es una proteína especialmente multifuncional, con dos dominios principales: el tercio N-terminal tiene actividad proteasa de serina, y los dos tercios C-terminales, de helicasa/NTPasa. Para sus funciones de proteasa de serina, que son las principales, NS3 se une a su cofactor, la proteína NS4A, constituyendo NS3-4A. NS3-4A es absolutamente

esencial en el ciclo del VHC, efectuando clivaje en 4 puntos de la poliproteína inicial de 3.000 aa. De este modo, libera las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (proteínas del complejo de replicación). Aún la actividad proteasa de NS3-4A no se restringe a dicha función: este dímero es capaz de interferir con la inmunidad innata del hepatocito al dificultar la detección del ARN bicatenario (ARNb) que el VHC forma temporalmente. Esta interferencia se produce bloqueando la vía de señalización del receptor *toll-like-3* (TLR-3) y la acción de la proteína-sensor intracelular de ARNb “gen del ácido retinoico inducible-I” (RIG-I), mediante el clivaje de los adaptadores MAVS y TRIF. En cuanto a la función como helicasa/NTPasa de NS3, aunque su papel exacto se desconoce, podría ser importante en la separación entre las hebras de ARN emergentes de las hebras de molde, para desenmarañar estructuras secundarias del mismo ARN, o para corregir eventuales uniones en lugares erróneos de las proteínas al ARN <sup>[30]</sup>. Por último, NS3 podría también ser carcinogénica.

Pasando a NS4B, esta proteína es también de gran importancia, pues se constituye en proteína estructural de membrana intracelular, y desde esta “palanca”, contribuye decisivamente a alterar la configuración membranosa del hepatocito, con la ayuda de otras proteínas como NS5A. Así, se acaba constituyendo la red membranosa intracelular, que es un entramado de membranas derivadas del RE, probablemente asociadas a las gotas lipídicas (también conocidas por el término en inglés como *lipid droplets*), sirviendo como andamio y microambiente para la replicación y ensamblaje del VHC <sup>[31]</sup>. Esta red delimita numerosas vesículas, mono-, bi- o multicapa, muchas de las cuales se comunican entre sí <sup>[32]</sup>. De nuevo, NS4B podría tener funciones extra en el ciclo del VHC al interactuar con las funciones celulares del hepatocito.

Respecto de NS5A, probablemente no se puedan explicar sus funciones con propiedad sin hablar de NS5B. NS5B es la polimerasa del VHC, encargada de replicar el ARN vírico. Se trata de una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) en la forma clásica de “mano derecha” con “dedos, palma y pulgar”, que se cierran en círculo en torno al sitio catalítico para producir ARN de sentido (+) y (-). NS5A por su parte, presenta dos dominios que le permiten actuar como bisagra de unión de NS5B a la red membranosa (ejerciendo así NS5B su función de polimerasa RdRp), para lo cual también se une a proteínas del hospedador como la ciclofilina A (CypA) entre otras. NS5A

probablemente es parte activa en inducir la formación de dicha red membranosa, tanto *per se* como en interacción con NS4B, a través de los mismos dos dominios descritos. Esta función de anclaje y reclutamiento es decisiva para la replicación vírica, pero aún le queda a NS5A un dominio más con el que contribuye al ensamblaje de las partículas víricas al unirse a otras proteínas como core. Parece que NS5A necesita multimerizar para ejercer adecuadamente todas estas funciones. El estado de fosforilación de NS5A es el que regula su funcionamiento, y curiosamente, dicho estado está mediado por quinasas de la célula hospedadora [30, 33, 34].

Queda la proteína p7, que tiene propiedades tanto estructurales como funcionales [35]. p7 se encuentra separando las proteínas E de las NE en la poliproteína, y una vez digerida y madurada a través de productos intermedios (Figura 6), su función más importante parece ser la de poro/canal iónico, habiéndose clasificado dentro de la familia de las vioporinas (clase IIA). Esta actividad como canal parece estar relacionada con la producción y liberación de las partículas víricas, al equilibrar el pH a ambos lados de las membranas en las que se integra. En cambio, p7 también resulta esencial para el ensamblaje al interactuar con NS2, de modo que p7/NS2 orquestarían el proceso físico de dicho paso. Esta segunda función sería completamente independiente de su actividad como canal iónico/poro.

Para finalizar, describimos la proteína F (de *frameshift*), también denominada proteína de marco de lectura alternativo (ARFP). Se trata de una forma alternativa de core, mal conocida, originada por un marco de lectura corrido una posición en sentido 5'→3', o bien 2 posiciones en sentido 3'→5'. Se desconoce su función, pero se sabe que se expresa de manera natural, al menos en las infecciones por genotipos 1, 2, 3 y 4a [36]. No se conocen otros productos de marcos de lectura alternativos, por lo que en la opinión del autor, el concepto de marco de lectura único del VHC puede mantenerse por ahora.

El funcionamiento integrado de todas estas proteínas se abordará en profundidad [más adelante](#), en la sección 1.6 (“Visión general del ciclo del VHC”).

### 1.3. Evolución genética del VHC a lo largo de la Historia: genotipos y subtipos.

#### Distribución mundial de los mismos.

- El VHC podría llevar miles de años infectando al hombre en formas endémicas.
- Hay 7 genotipos del VHC, de los cuales el más frecuente es el 1 (50%), tanto a nivel mundial como nacional.

Por ahora no se conoce gran cosa sobre el tiempo que el VHC lleva sobre nuestro planeta, si bien se podrían hacer estimaciones indirectas y más o menos groseras. Para ello, se pueden investigar tantos factores del hospedador como víricos. Si tomamos el punto de vista del hospedador, según la filogenia de la inmunidad innata en seres humanos, se puede observar que la mutación que condujo a la pérdida del interferón- $\lambda 4$  (IFN- $\lambda 4$ ) no se encuentra en los primates vivos más cercanos evolutivamente a nuestra especie <sup>[37]</sup>. Este dato es importante para estimar la edad del virus porque se puede interpretar que la mutación pudo seleccionarse, al menos en parte, por la presión selectiva que ejerce el VHC o su posible antecesor. Esto nos da un máximo de 5-9 millones de años, que es el tiempo en el que chimpancés y bonobos, los primates no humanos más cercanos al hombre, llevan evolucionando separadamente de nuestra actual rama <sup>[38, 39]</sup>. De hecho, un estudio reciente mostró que esta mutación nació hace aproximadamente 56.000 años, y en una sola ocasión <sup>[40]</sup>.

Tomando el enfoque virológico, hay que empezar diciendo que el ancestro del VHC no se conoce. Hasta hace pocos años, no se había encontrado prácticamente ningún virus emparentado con el VHC, por lo que su origen constituía un misterio, y a semejanza del VIH-1, resultaba tentador pensar en los primates no humanos como reservorio inicial <sup>[41]</sup>. Sin embargo, ha resultado que el hepacivirus animal más cercanamente emparentado con el VHC infecta a caballos y está muy extendido por el mundo. De hecho, en estos años se está demostrando infección por diversos hepacivirus en caballos, ganado bovino, perros, pequeños roedores, e incluso murciélagos <sup>[42-48]</sup>. No parece haber motivos para negar su presencia en más especies de mamíferos. El tropismo tisular de estos virus podría ser variado; por ejemplo, en el caso de los perros, el ARN vírico se puede detectar en secreciones respiratorias. No se puede saber con



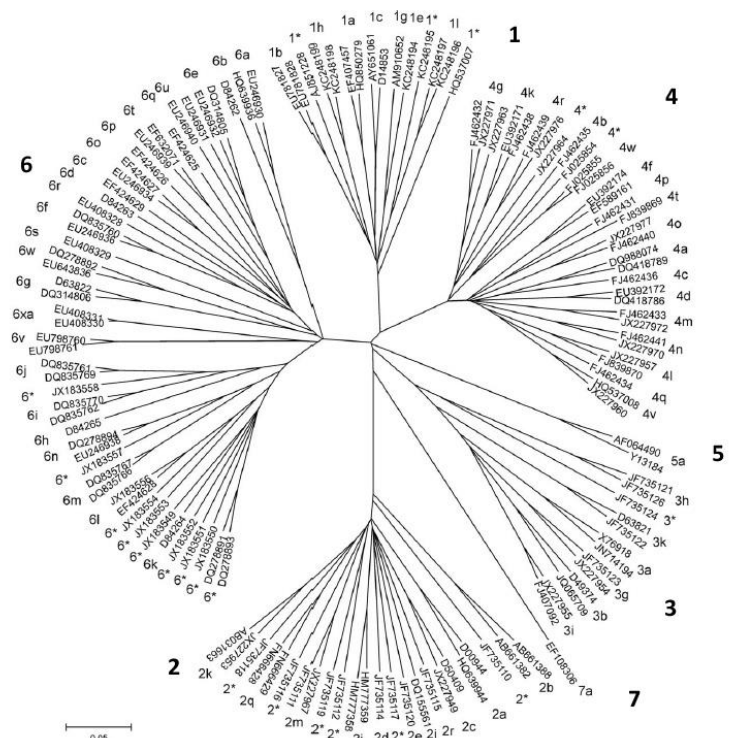
seguridad cuándo, pero el contagio de alguno de estos virus (o sus antecesores) a humanos es una opción. Por su parte, las estimaciones basadas en modelos para tratar de determinar la edad evolutiva del VHC no han arrojado mucha luz, aunque sí sugieren un tiempo mínimo de evolución de varios siglos <sup>[49]</sup>.

Así pues, tenemos un tiempo máximo de 5-9 millones de años, un tiempo mínimo de siglos, y un tiempo intermedio de miles de años. Por lo tanto, si consideramos al antecesor del VHC como una zoonosis que pudo dar el salto a humanos, al estilo de otros virus como el virus de la hepatitis E (VHE) genotipo 3, el *Influenzavirus* de la gripe, el VIH, o el virus del ébola (VEBO) <sup>[3, 41, 50, 51]</sup>, parece lógico pensar que en el caso del VHC o su antecesor, este paso pudo darse en humanos que estuvieron en contacto con productos infecciosos de algún animal, posiblemente ungulado. Basándose en estas consideraciones, se puede resolver que el VHC lleva largo tiempo con nuestra especie, quizás miles de años en formas endémicas, lo cual explicaría sus pequeñas diferencias con los otros *Flaviviridae*, su gran diversidad genética, y la complejidad de su ciclo.

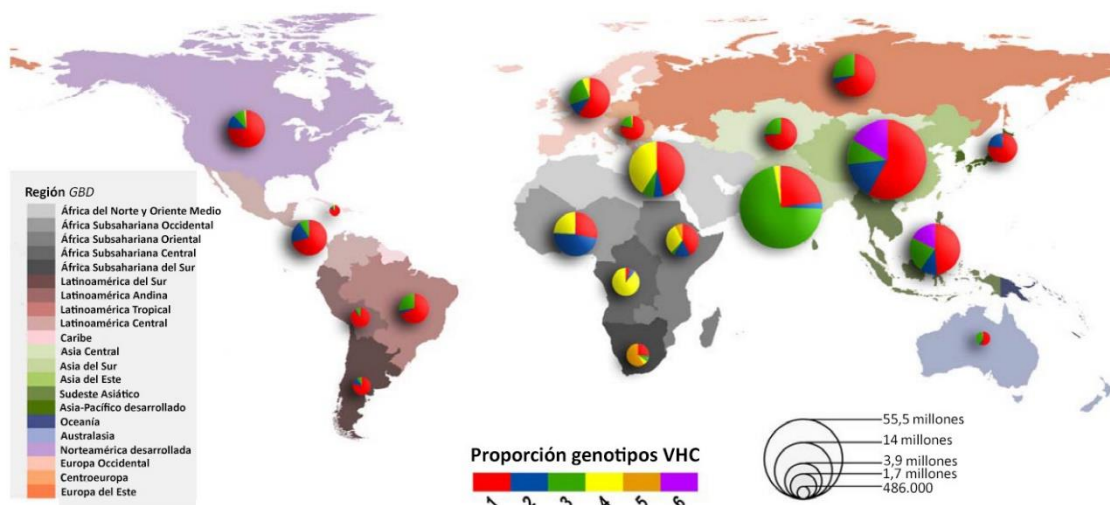
Actualmente hay un total de 7 genotipos del VHC identificados, que se numeran por orden del 1 al 7, basándose en el estudio filogenético del genoma completo del virus (Figura 7) <sup>[52]</sup>. La distribución mundial de dichos genotipos depende de los diferentes países o regiones, si bien la mayor parte corresponde al genotipo 1 (Figura 8) <sup>[53]</sup>. Dicha distribución refleja de algún modo la globalización de los comportamientos humanos contemporáneos que de hecho han convertido a la enfermedad en una pandemia: como hemos dicho, el genotipo más prevalente es el 1 (cerca del 50%), siendo los subtipos 1a y 1b los más frecuentes. Este hecho podría estar relacionado, especialmente en el subtipo 1b, con la transfusión de hemoderivados que se generalizó a partir del Siglo XX, y que constituyó sin duda una importante fuente de contagio antes del descubrimiento del VHC <sup>[54]</sup>. Claramente, el genotipo 1 es el preponderante en Europa, América y el Este de Asia. El subtipo 1b es más frecuente en Europa y el 1a en Estados Unidos de América (EEUU) y Canadá. El siguiente genotipo más frecuente es el 3 (30% del total), la mayor parte del cual se concentra en el Sur de Asia. En cambio, existe una diseminación del subtipo 3a por todo el Globo, atribuible al ADVP <sup>[55]</sup>. Le siguen en orden de prevalencia los genotipos 2 y 4 (en torno al 8%), frecuentes en el Este de Asia y Norte de África/Oriente Medio, respectivamente. Es de destacar la alta prevalencia de VHC en

Egipto (casi exclusiva del genotipo 4), donde la seropositividad para anticuerpos anti-VHC ronda el 13% <sup>[9, 56]</sup>. Este hecho se atribuye en su mayor parte a la inoculación accidental del virus durante una campaña sanitaria de vacunación masiva contra el esquistosoma en los años 1930-1950 con agujas no esterilizadas <sup>[57]</sup>. El genotipo 6 (5%) es por su parte, casi exclusivo del Sudeste Asiático. El genotipo 5 (< 1%) parece el menos frecuente, y se ha descrito sobre todo en las zonas más al Sur y Este del África Subsahariana, aunque su verdadera área endémica aún no está claramente definida. En cuanto al genotipo 7, sólo hay un caso descrito en Canadá, aislado de un paciente de origen centroafricano, que es el 7a <sup>[52, 58]</sup>.

En el caso de España, y acordemente con lo recién expuesto, el genotipo más frecuente es el 1 (66% aproximadamente), sobre todo 1b, aunque también hay un alto porcentaje de pacientes infectados por genotipo 3 (20% aproximadamente), achacable fundamentalmente al ADVP, aparte de la inmigración. Se ha venido notificando un aumento del genotipo 4 en los últimos años, probablemente por efecto de la inmigración, sin perder de vista de nuevo el ADVP como factor de riesgo <sup>[10, 59]</sup>.



**Figura 7.** Árbol filogenético que muestra la distancia genética entre los diferentes genotipos y subtipos del VHC (Fuente: modificado de Smith et al., 2014).



**Figura 8.** Distribución de los genotipos del VHC y su prevalencia en las diferentes regiones GBD de la OMS (Fuente: modificado de Messina et al., 2015). Nótese que el genotipo 7 no se incluye por ser casos aislados.

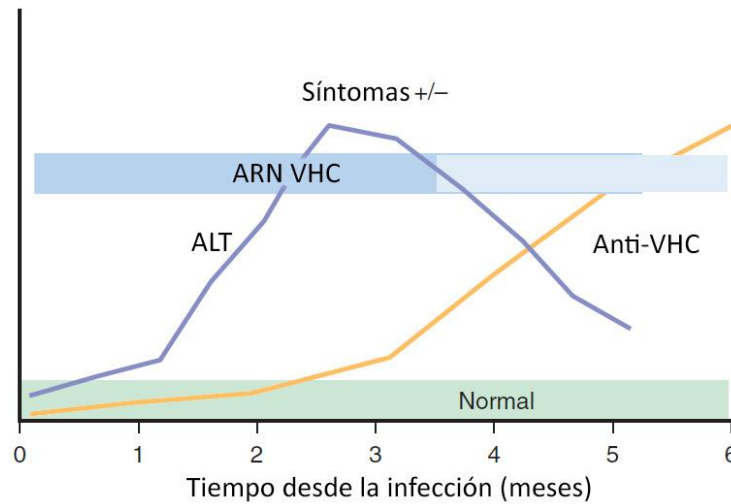
### 1.4. Historia natural de la infección por VHC.

- La hepatitis C aguda suele pasar desapercibida, y cronifica aproximadamente en el 20% de los casos.
- La hepatitis C crónica lleva a cirrosis en el 20% de los casos tras 20-30 años de evolución.

La epidemiología del VHC es más fácil de comprender cuando se examina la patocronia de la enfermedad producida por su infección.

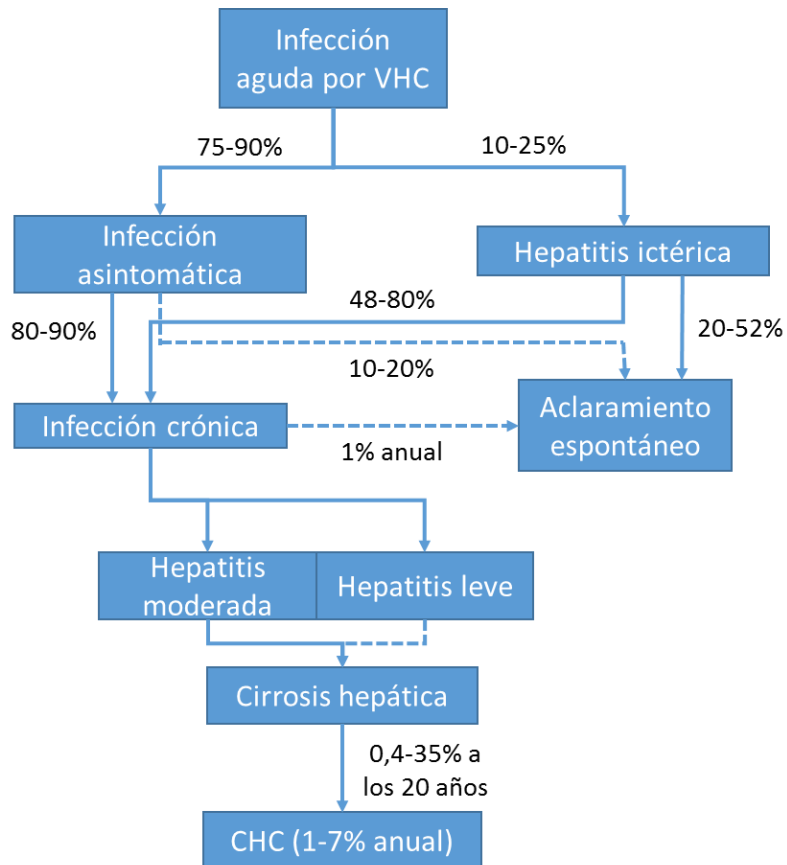
La infección por VHC produce viremia detectable en escasos días, seguida rápidamente de una hepatitis aguda que suele resultar pauci- o incluso asintomática (Figura 9). En los casos sintomáticos, las manifestaciones clínicas suelen ser las propias e inespecíficas de las hepatitis, y sólo un 15% aproximadamente de los pacientes presentará ictericia. La hepatitis fulminante es prácticamente inexistente <sup>[60]</sup>. Por estos motivos, la hepatitis C aguda suele pasar desapercibida; se podría decir que la complicación principal de la hepatitis C aguda es precisamente su cronificación. Los escasos estudios de alta calidad que se han logrado efectuar con la hepatitis C aguda, muestran una tasa de aclaramiento espontáneo de en torno al 20%, con mucha variabilidad <sup>[11]</sup>. Los anticuerpos anti-VHC, que no son protectores, se desarrollan 5-6 semanas tras la aparición de viremia detectable. Tradicionalmente se han considerado los 6 meses como frontera para clasificar la hepatitis como crónica, y aunque la mayor parte de los aclaramientos espontáneos se han producido ya en dicho lapso, hay casos que necesitaron hasta 620 días para la consecución de un ARN indetectable sin necesidad de tratamiento <sup>[61]</sup>. Los principales factores predictivos para aclaramiento espontáneo son el sexo femenino, la hepatitis clínicamente manifiesta (especialmente si es icterica), y factores genéticos como el genotipo del polimorfismo del

IFNL4/interleuquina-28B (IL-28B) o el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II [11, 37, 62][63].



**Figura 9.** Gráfica esquemática del curso de la hepatitis C aguda (Fuente: adaptado de Boyer et al., 2012). “ALT”: Alanino-aminotransferasa.

Una vez la infección se ha convertido en crónica, como mínimo, tras 6 meses de persistencia, ésta se caracteriza por una hepatitis más o menos indolente que lleva a la cirrosis en un 10-20% de los pacientes tras 20-30 años de inflamación continuada (Figura 10). De nuevo, las cifras son muy variables según los estudios. Lo importante es que, dado todo lo expuesto anteriormente, muchos de los pacientes no se diagnostican hasta que debutan con una enfermedad hepática avanzada, típicamente, el primer episodio de descompensación de una cirrosis. Porque una vez se ha establecido dicha cirrosis, hay un riesgo anual de CHC del 1-7% y un riesgo anual de descompensación del 3-6%. A partir de estos acontecimientos cardinales, la enfermedad suele avanzar mucho más deprisa: una vez se ha desarrollado el primer episodio de descompensación clínica, por ejemplo, existe un riesgo de muerte del 15-20% durante el año posterior [11, 13]. Es de nuevo pertinente recordar aquí el nombre de “pandemia silenciosa”.



**Figura 10.** Organigrama resumen de la patocronia del VHC (Fuente: adaptado de Boyer et al., 2012). Las cifras son aproximadas, dada la gran variabilidad de los estudios epidemiológicos y microbiológicos realizados hasta la fecha. “CHC”: Carcinoma hepatocelular.

### 1.5. Particularidades de la infección por VHC en el trasplante hepático.

- La reinfección del injerto es universal si el TH se hizo con carga viral detectable.
- La historia natural de la infección está acelerada en el TH: la incidencia de cirrosis es del 20-30% a 5 años.
- La respuesta al tratamiento sin interferón es buena, todo lo contrario que los regímenes basados en interferón.

La historia natural de la infección por VHC descrita en el apartado anterior no se desarrolla de igual modo en el caso especial de los pacientes con TH. Dado que una parte considerable de esta tesis tiene por objeto el entorno del TH, desarrollaremos brevemente las características específicas que presenta la infección en esta población.

La reinfección por VHC del injerto es universal si el paciente tenía carga viral detectable antes del TH, y se producirá en un porcentaje variable si la carga viral era negativa pero no se había llegado a una respuesta virológica sostenida (RVS) [64].

La patocronia de la hepatitis C en este grupo de pacientes viene marcada por dos hechos fundamentales: 1) Los pacientes receptores de un injerto hepático son un caso de quimera, esto es, son una mezcla genética de dos individuos, pues conjugan dos genomas diferentes en la misma persona: el del receptor y el del injerto [65-68]. 2) Como consecuencia, estos pacientes necesitan tomar medicación inmunosupresora para evitar el rechazo del injerto. Estos dos factores parecen condicionar unas particularidades inmunológicas/inflamatorias que marcan la evolución de la infección.

La hepatitis aguda por recidiva del VHC tras el TH suele ser escasamente sintomática, al igual que en los pacientes inmunocompetentes (generalmente con cargas virales muy altas), aunque en menos del 5% puede darse un tipo de recidiva muy agresiva, llamada hepatitis colestásica fibrosante (HCF), y en un porcentaje algo mayor, pueden darse otras formas agudas graves [69, 70]. Tras la infección del injerto, se produce una progresión acelerada de la enfermedad, con infiltrado inflamatorio intenso y un rápido depósito de fibra colágena, de tal manera que el 20-30% de los enfermos padecerá cirrosis en 5 años [3]. Este subgrupo de enfermos con rápida progresión hacia cirrosis se ha venido a denominar “fibrosadores rápidos”, en contraposición al subgrupo

de “fibrosadores lentos”, cuyo curso sería más próximo al de los inmunocompetentes [71, 72]. Factores de riesgo reconocidos para fibrosis rápida son: edad avanzada del donante; sexo femenino del receptor; necesidad de bolos de corticoides; diabetes *mellitus* precoz postrasplante; infección por citomegalovirus (CMV), y complicaciones biliares [3]. Todas estas particularidades asociadas a la recidiva postrasplante, condicionan una disminución global en la supervivencia de los pacientes [73]. Como puede verse, el impacto de la recidiva postrasplante por VHC es muy alto, llevando frecuentemente al retrasplante si no se elimina el virus.

Paradójicamente, el alto porcentaje de reinfección por VHC y la rápida progresión de la enfermedad, todo a partir de un punto temporal conocido, convierten al TH en un entorno privilegiado para estudiar los fenómenos agudos de la infección y comprender más en profundidad ciertos factores inmunogenéticos [64, 74, 75].

Hasta hace poco tiempo, aún en la etapa histórica del tratamiento basado en interferón (IFN), el panorama era ciertamente desfavorable. Los efectos adversos, extremadamente frecuentes, eran por lo general más graves y con peor tolerancia que en los pacientes inmunocompetentes, llevando a la suspensión del tratamiento en un tercio de los trasplantados. Asimismo, y en parte por lo anterior, el porcentaje global de RVS era discreto, en torno al 30% [76-78]. Por estos motivos, ha venido siendo especialmente útil el uso de factores predictivos de mala evolución, como el gradiente de presión venosa hepática (GPVH)  $\geq 6$  mm Hg o la presencia de fibrosis significativa (F  $\geq 2$ ), ambos al año del trasplante [71, 72]. Los pacientes que cumpliesen dichos criterios (“fibrosadores rápidos”) serían candidatos a tratamiento antiviral antes de llegar a una cirrosis de rápida instauración.

Afortunadamente, las nuevas terapias sin interferón están resultando particularmente beneficiosas y razonablemente seguras. Se expondrá todo lo concerniente a dichos tratamientos [más adelante](#), en el apartado 1.9 (“Los rápidos avances en el tratamientos del VHC”).



### 1.6. Visión general del ciclo del VHC, incluyendo sus modelos de estudio.

- El desarrollo de los sistemas de estudio del VHC en los últimos 15 años ha marcado la manera en que nos hemos aproximado a su ciclo y el desarrollo de fármacos.
- El VHC circula unido a lipoproteínas.
- La entrada del VHC necesita de numerosos correceptores celulares.
- Una vez procesada la poliproteína, las proteínas víricas forman la red membranosa intracelular y el complejo de replicación.
- Después de acumulada una cierta carga crítica de componentes, se forma el complejo de ensamblaje, en asociación con las gotas lipídicas.
- La maduración final de los viriones se hace en acoplamiento con la vía de secreción de VLDL.
- Al usurparse mecanismos fisiológicos celulares, numerosos factores dependientes del hospedador toman parte en todos estos procesos.

Una vez que conocemos el gran problema mundial que supone el VHC, tanto por epidemiología como por la particular historia natural de su infección, y que tenemos claros los aspectos estructurales y genéticos, se puede abordar el ciclo con propiedad. Como antes se ha apuntado, el ciclo del VHC es muy complejo y dinámico, y aún no está completamente caracterizado, si bien se han producido avances extraordinarios a lo largo de los últimos 15 años, que rápidamente se han traducido en más y mejores tratamientos (ver [más adelante](#) sección 1.9 “Los rápidos avances en el tratamiento del VHC”). Así, estudiar y comprender el ciclo del VHC es un paso previo fundamental para progresar en el manejo de la hepatitis C. Por un lado, se pueden encontrar factores que nos permitan predecir la posible respuesta cuando los tratamientos son peligrosos o costosos. Por el otro, se pueden identificar dianas terapéuticas, tanto sobre el virus como sobre la célula hospedadora, que permitan ampliar el arsenal terapéutico disponible para dicho tratamiento.

En este apartado, se dará una visión general del ciclo del VHC para pasar en los apartados siguientes a profundizar en aspectos concretos que son objeto de esta tesis. Terminológicamente hablando, se ha decidido hablar de “ciclo” a secas, sin añadirle el

adjetivo “vital”, pues existe controversia acerca de si los virus llegan a seres vivos o no. Lo único que tiene claro el autor es que si no lo son, entonces son algo muy parecido a seres vivos, sistemas al fin y al cabo que mantienen una baja entropía interna a costa de la entropía de otros sistemas. Si bien, con el ánimo de mantenerse alejado de controversias que distraen, mantendremos el sustantivo sin adjetivar.

Como se ha apuntado más arriba, el desarrollo de los distintos sistemas de estudio del VHC en los últimos 15 años ha marcado la manera en la que nos hemos aproximado al ciclo del VHC, y cómo se han hallado fármacos más efectivos y potentes. Desde su primera descripción en 1989, el VHC ha sido objeto de intensas investigaciones, pero fue a partir de 1999, con el desarrollo del primer sistema de replicón subgenómico, cuando la investigación del ciclo comenzó a acelerarse [8, 79]. Brevemente, los replicones subgenómicos son un constructo formado por un ARN bicistrónico que codifica para las proteínas del complejo de replicación del VHC del genotipo que interese, conservando las dos UTR, junto con un gen reportero que permite detectar e incluso cuantificar la replicación (genes de resistencia a Neomicina, de luciferasa, de la proteína verde fluorescente, etc.). La traducción del replicón se completa gracias a una segunda región promotora heteróloga, situada entre el gen reportero y los genes del complejo de replicación. Los replicones subgenómicos supusieron un punto y aparte en la carrera por caracterizar y comprender el ciclo del VHC, pues permitieron estudiar a fondo su replicación en células Huh-7 de carcinoma hepatocelular humano (y otras posteriormente), facilitando en última instancia el desarrollo de fármacos. En 2003, dos autores en paralelo describieron por vez primera el sistema de pseudopartículas víricas (VHCpp) basadas en retrovirus [80, 81]. Este sistema se basa en la generación de partículas con las proteínas E1 y E2 del VHC en su superficie, muy similares a los viriones del VHC aunque sin genoma en su interior. Resumidamente, se cotransfectan células humanas embrionarias de riñón 293T con 3 constructos diferentes: uno que contiene los genes de E1 y E2, otro con los genes “gag” y “pol” (de cápside y polimerasa, respectivamente) retrovirales, y el tercero, con un gen reportero, como la proteína verde fluorescente. Dentro de las 293T se produce exclusivamente la encapsidación con posterior liberación de las pseudopartículas, que pueden recogerse para infectar células diana como Huh-7. Esta infección puede medirse gracias a la

expresión del gen reportero que viene en el interior de las pseudopartículas, dado que se integra en las células diana por venir en un vector retroviral. Gracias al VHCpp se ha estudiado en profundidad la entrada del VHC a la célula hospedadora, e incluso ciertos aspectos serológicos. Finalmente, en 2005 se encontró que un clon de VHC de subtipo 2a aislado de un paciente japonés con un raro caso de hepatitis fulminante (denominado JFH-1, de *Japanese fulminant hepatitis 1*), era capaz de replicar con eficiencia en células Huh-7 y otras <sup>[82]</sup>. Rápidamente, en sucesivas publicaciones, se comprobó que todos los postulados clásicos de Koch para un agente infeccioso se cumplían, y el llamado sistema de VHC derivado de cultivo celular (VHCcc) acabó de dar el espaldarazo necesario para llegar al momento histórico actual <sup>[83-85]</sup>.

Por su parte, los modelos animales, aunque han aportado contribuciones importantes, no han logrado la idoneidad para el estudio del VHC. Los más importantes han venido siendo el chimpancé (*Pan troglodytes*), que actualmente está en desuso por consideraciones éticas y alto coste, y el ratón (*Mus musculus*) humanizado <sup>[86]</sup>. Las investigaciones desarrolladas para la presente tesis se han hecho directamente sobre muestras de pacientes infectados.

### 1.6.1. Entrada y desencapsidación del VHC.

Comenzaremos la descripción del ciclo siguiendo el viaje de una partícula vírica infecciosa a través de la sangre de un sujeto infectado. Estas partículas circulan en un porcentaje bajo como viriones aislados, generalmente asociados a moléculas de inmunoglobulina M (IgM), y son de dudosa infectividad <sup>[25]</sup>. En cambio, la mayor parte del VHC circula asociado a lipoproteínas séricas, constituyendo partículas lipovirales (PLV). En concreto, el VHC se asocia a las apolipoproteínas A-I (apoA-I), apoB-48, apoB-100, apo-C-I y apoE, constituyendo una especie de híbrido entre LDL y HDL si atendemos a la densidad <sup>[31]</sup>. Esta forma de circulación podría conceder varias ventajas, dado que dotándose de esta suerte de “disfraz”, el VHC podría escapar a los anticuerpos circulantes, y también entrar con mayor facilidad a la célula hospedadora.

El VHC presenta un hepatotropismo claro, donde se sabe a ciencia cierta que cumple el ciclo completo. Sin embargo, también está descrita su presencia en varios compartimentos o estirpes celulares, como células mononucleares de sangre periférica,

células dendríticas o en el sistema nervioso central <sup>[87-91]</sup>. En cualquier caso, se necesita todo un conjunto de correceptores para lograr la entrada efectiva y óptima de una PLV a su célula hospedadora <sup>[31]</sup>. Cuando una PLV contacta con el polo sinusoidal del hepatocito, las primeras interacciones, que son de baja afinidad, corresponden al sistema de entrada natural de lípidos en la célula. Así, el receptor de LDL (LDLR) y ciertos glucosaminoglucanos (GAG) interaccionan probablemente con Apo-E. Acto seguido, entra en juego el receptor *scavenger* de clase B-I (SRB1, SRBI o SCARB1), que se expresa en grandes cantidades en la superficie del hepatocito por tener funciones fisiológicas para la entrada de las lipoproteínas HDL, LDL y VLDL. SRB1 se une a la proteína E2 de la envuelta del VHC, a la que induce un cambio conformacional en relación con la HVR1, que deja a E2 lista para unirse con el siguiente receptor celular: CD81. CD81 fue el primer correceptor del VHC que se descubrió, siendo éste una ubicua tetraspanina de superficie <sup>[92]</sup>. CD81 se une directamente a E2 modificada, y a continuación a Claudina 1 (CLDN1), proteína que se expresa en su mayor parte en las uniones estrechas de las caras basolaterales de los hepatocitos, donde también se encuentra la proteína Ocludina (OCLDN). Por tanto, se produce un movimiento lateral del complejo formado por PLV-SRB1-CD81 hacia dicha cara, donde aparte de CLDN1 y OCLDN, el receptor de colesterol tipo Niemann-Pick C1 1 (NPC1L1) del canalículo biliar acaba de completar el proceso de internalización vírica <sup>[93]</sup>. El subtipo de CD81 y de OCLDN parecen determinar la especificidad del VHC por los hepatocitos humanos <sup>[94]</sup>. Como factores adicionales, el receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR), el receptor 2 de efrina tipo A (EPHA2), la proteína HRAS, la proteína quinasa A (PKA) y la GTPasa RHO parecen modular las interacciones entre SRB1, CD81 y CLD1 <sup>[95-97]</sup>. El receptor de transferrina 1 (TRF1) también tiene un papel importante en estos pasos <sup>[98]</sup>. En cualquier caso, SRB1, CD81, CLDN1 y OCLDN constituyen el conjunto mínimo necesario de factores del hospedador para la entrada del VHC.

Tras el proceso anterior, el complejo PLV-correceptores se internaliza por endocitosis dependiente de clatrina, produciéndose finalmente la fusión de la envuelta externa con la membrana endosómica en un proceso mediado por bajo pH, y consecuentemente, la liberación del genoma vírico al citosol.

Es importante añadir que además de la entrada del VHC desde la sangre, también parece producirse transmisión vírica entre células (llamada “célula a célula”), que permite a la infección propagarse de una manera alternativa por la cara basocelular, y que probablemente hace uso de algunas de las vías arriba descritas <sup>[99]</sup>. Así, parece que el VHC se siembra aleatoriamente por vía hematógena, y que a partir de ahí se propaga localmente en forma de “racimos” (*clusters*) de hepatocitos infectados <sup>[100]</sup>.

### 1.6.2. Traducción y procesamiento de la poliproteína. Replicación del VHC.

Cuando el ARN vírico está libre en el citosol, debe traducirse en el RE rugoso. En ello, las UTR (especialmente UTR 5'), tienen un papel fundamental. Los dominios II, III y IV de UTR 5', junto con 24-40 nucleótidos de la región codificante de core, constituyen el denominado sitio de entrada interna al ribosoma (IRES). Este IRES le permite al ARN vírico comenzar la traducción sin la necesidad de factores de transcripción canónicos. Estos procesos se explican con mayor detalle [más adelante](#) (sección 1.7., “*P-bodies* y gránulos de estrés. Concepto y papel en el ciclo del VHC”), pues interesan a los objetivos de la presente tesis.

Una vez traducido el genoma, se procesa la poliproteína por proteasas tanto del virus como del hospedador. Se ha explicado este proceso con más detalle [más atrás](#) (sección 1.2., “Taxonomía y estructura del VHC”). Con las proteínas libres, se puede completar al fin toda la parte intracelular del ciclo. De este modo, las proteínas del complejo de replicación se asocian entre sí para cumplir sus funciones, al tiempo que se forma la ya mencionada red membranosa intracelular, con la que también se asocian. Es decir, el VHC, al igual que todos los virus ARN (+), desvía las funciones celulares fisiológicas y adapta físicamente el ambiente interno al servicio de su propio ciclo. Apoyándose sobre la red membranosa intracelular, el complejo de replicación produce hebras de ARN (-) complementarias del ARN (+) inicial. Estas hebras (-) servirán de molde para sintetizar más ARN (+). Por tanto, temporalmente habrá ARNb dentro de la célula. Los ARN (+) se encapsidarán para generar nuevos viriones, se traducirán o se usarán como molde para sintetizar más hebras de ARN (-) <sup>[26]</sup>. El equilibrio formado por estos 3 extremos se regula en parte gracias a factores de la célula hospedadora, tal y como se explicará en el siguiente apartado. Todo este proceso de formación de la red

membranosa intracelular y de replicación está íntimamente relacionado, y por tanto regulado, por los lípidos intracelulares y su metabolismo.

En estas etapas, de nuevo se produce la colaboración “forzosa” del hospedador con múltiples factores, la mayoría quinasas. La quinasa de proteína R (PKR), un sensor de ARNb, reconoce las UTR 5' y 3', y aunque está implicada en la respuesta de IFN al VHC, también inactiva por fosforilación al factor de iniciación eIF2 $\alpha$  [101-103]. Este fenómeno probablemente facilite el ciclo del VHC, tal y como se explicará en el apartado siguiente. La quinasa de lípidos PI4KIII $\alpha$  tiene un papel muy importante en la replicación y formación de la red membranosa intracelular, y en parte regula el estado de fosforilación de NS5A, confirmando la necesidad que tiene el VHC de utilizar el metabolismo de los lípidos en todas las fases de su ciclo [34]. La CypA es otra proteína de gran importancia que también se une a NS5A, al parecer en el mismo sitio que NS5B, y que probablemente induzca en NS5A el cambio conformacional necesario para la replicación [104].

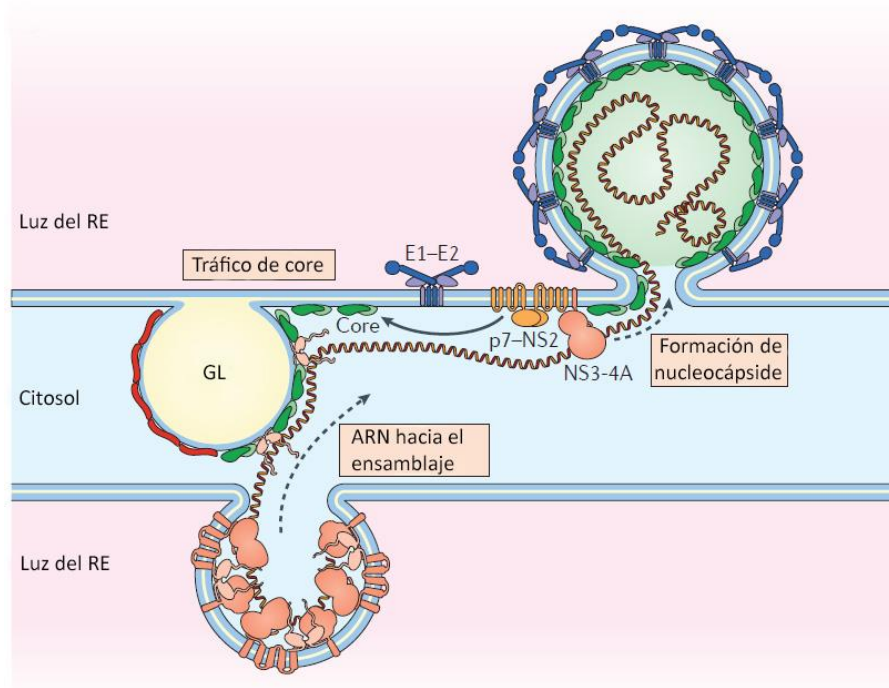
A nivel sistémico, todo el proceso acaba generando unos 10<sup>12</sup> viriones por día en un paciente dado [105]. Aquí resulta importante aclarar que la polimerasa RdRp no tiene función correctora, por lo que, teniendo en cuenta la alta tasa de replicación, se produce una variabilidad genética no despreciable en la carga vírica total del paciente. Por tanto, aún dentro del subtipo, la población de virus que coexisten en un mismo individuo se conoce como cuasiespecies, es decir, una población de genomas estrechamente emparentados con una variación nucleotídica del orden del 1-2% [52, 106].

### 1.6.3. Ensamblaje y secreción.

Estos dos procesos son los peor conocidos de todo el ciclo. Lo que está claro es que los lípidos, de nuevo, juegan un papel fundamental. Parece que el sistema de membranas (y los complejos de replicación con él) se disponen en estrecha relación con las GL [31, 107, 108]. Esta cercanía facilitaría el ensamblaje del VHC. Según el modelo actualmente aceptado, core se iría acumulando en la superficie de las GL, uniéndose desde allí a NS5A, y por tanto reclutando en su cercanía a todo el complejo de replicación, lo cual incluye al ARN en producción (es decir, asociando el RE/red membranosa con las GL del citosol). Por su parte, E1 y E2 también se reclutarían a dichas inmediaciones para

## 1. Introducción

el ensamblaje en ciernes. Se podría decir que de este modo, se forma un auténtico complejo de ensamblaje (Figura 11). A partir de aquí, con p7, NS2 y NS3 como directores de orquesta, se formarían las nucleocápsides junto con la envuelta externa, las cuales se cargarían con ARN (+), mientras geman desde el ER/red membranosa <sup>[31]</sup>. A partir de este punto, la morfogénesis de los viriones se acoplaría a la vía secretora de VLDL, con lo que acabarían de madurar y adquirir su baja densidad característica. Esto ocurriría conforme se van asociando a apolipoproteínas en su tránsito a través del aparato de Golgi. Finalmente, los viriones maduros emergerían de la célula, soportando el bajo pH necesario para la fusión de membranas gracias a la función viroporina de p7.



**Figura 11.** La interacción de p7-NS2 con NS3 recluta a core al sitio definitivo de ensamblaje del VHC, desde la superficie de las gotas lipídicas, junto con el ARN y E1/E2 (Fuente: adaptado de Brett et al., 2013). "GL": Gotas lipídicas.

Por estar el ensamblaje tan interrelacionado con el metabolismo intracelular de lípidos, existen varias proteínas del hospedador que contribuyen al mismo de manera decisiva. Por ejemplo, la fosfolipasa A2 citosólica regulada por MAPK (cPLA2) y la diacilglicerol O-acetiltransferasa (DGAT1) son clave en el tráfico de core a las GL. Otras, como el complejo proteico de unión a clatrina 2 de cadena media (AP2M1) son de capital

importancia para llevar core desde las GL al lugar de ensamblaje. Nótese que la esteatosis y las alteraciones del metabolismo lipídico habituales en los pacientes con hepatitis C muy probablemente estén relacionadas con la formación de los complejos de ensamblaje <sup>[107]</sup>.



### 1.7. *P-bodies* y gránulos de estrés. Concepto y papel en el ciclo del VHC.

- Los *P-bodies* son gránulos intracelulares de ARN que controlan la expresión génica mediante secuestro o degradación del ARNm. Se encuentran en condiciones normales del ciclo celular.
- Los gránulos de estrés son gránulos intracelulares de ARN que sirven para detener bruscamente la traducción de ARNm por secuestro. Surgen en condiciones de estrés celular.
- El VHC usurpa algunos componentes de *P-bodies* y gránulos de estrés en beneficio propio.

La compartimentalización dentro de cada célula es uno de los típicos hitos definitorios del dominio *Eucariota*. En el citoplasma de las células eucariotas, estos compartimentos incluyen los orgánulos citoplásmicos clásicos como el RE, pero también gránulos sin membrana formados por ribonucleoproteínas mensajeras (RNPm), que son una combinación de ARN mensajero (ARNm) y proteínas, y que posiblemente se originaron en épocas anteriores a la “invención” del ADN <sup>[109, 110]</sup>. Probablemente, en dichas épocas, diversos ARN con funciones enzimáticas trabajarían codo con codo con otras proteínas, independientemente de los propósitos de la herencia. A lo largo de las últimas décadas, se han definido gránulos de ARN de lo más diverso y novedoso en las células eucariotas, todos formados por las interacciones entre varias RNPm <sup>[111, 112]</sup>. Entre ellos, los mejor caracterizados son los cuerpos de procesamiento, más conocidos como *P-bodies*, y los gránulos de estrés (GE). Ambos contienen RNPm que aunque incluyen ARNm, no están involucradas en la traducción. Estos gránulos de ARN están emergiendo como elementos de control claves para el metabolismo del ARNm y su desregulación se ha relacionado con la patogenia del cáncer, enfermedades degenerativas e infecciones víricas <sup>[113-118]</sup>

Recientemente, varios artículos han subrayado la estrecha relación establecida entre estos gránulos y los virus de ARN (+) como el VHC <sup>[116, 119]</sup>. Como los gránulos de ARN controlan el ciclo del ARNm, el metabolismo y la expresión génica, no es sorprendente que algunos virus con genomas que funcionan como ARNm manipulen

dichos gránulos en su propio beneficio, aunque como veremos, podría resultar paradójico desde algunos puntos de vista.

### 1.7.1. Concepto y función de los *P-bodies*.

Los *P-bodies* se descubrieron hace poco más de una década <sup>[120-122]</sup>. Estos gránulos de ARN están presentes en el citosol de la célula eucariota bajo condiciones normales de crecimiento, aunque aumentan en número y tamaño en respuesta al estrés y otras condiciones que conlleven una parada en la traducción. Los *P-bodies* están compuestos por ARNm reprimidos traduccionalmente junto con proteínas de las vías de degradación de los ARNm. Adicionalmente, en los mamíferos, estas proteínas incluyen la maquinaria de los microARN (miARN). Y sea en mamíferos o no, se han descrito muchas proteínas involucradas en estas maquinarias y vías de degradación del ARNm. Todas ellas constituyen subunidades sumables entre sí, cada una con distintas funciones. Hay descritas 2 vías metabólicas principales para dicha degradación, y ambas comienzan con un proceso de desadenilación, en el que se da el acortamiento de la cola de poliadenosina (poly-A) del ARNm <sup>[123]</sup>. Desde este punto e independientemente de cuál de las 2 vías, una compleja secuencia de pasos enzimáticos lleva a la degradación del ARNm, implicando bastantes proteínas que tienen que ver con la “decapitación” (*decapping*) del ARNm (Dcp1, Dcp2, rck/DDX6, PatL1, LSm 1-7, Rap55 y Edc3), o que directamente lo degradan (complejo Ski, Xrn1) <sup>[110]</sup>.

Todos estos componentes (proteínas y ARN) ciclan rápidamente dentro y fuera del gránulo, indicando un intercambio dinámico de moléculas con el citosol, lugar donde todos ellos se encuentran difusamente localizados ([Figura 12](#)). Así, los *P-bodies* parecen ser un estado temporal de acumulación más que estructuras estables. Para ello, parece que en ciertas condiciones o modelos se pueden comportar como gotas líquidas en una fase separada del citosol, y en otros, se podrían comportar más bien como agregados sólidos a través de proteínas formadoras de fibras de tipo prion <sup>[124, 125]</sup>. Pero sorprendentemente, los componentes de los *P-bodies* son aún capaces de funcionar disgregados difusamente por el citosol. Por tanto, los *P-bodies* como estructuras detectables no son esenciales para el control global de la degradación de ARNm o de la represión de su traducción <sup>[126-129]</sup>. Sin embargo, cuando los *P-bodies* están presentes como tales, se puede asumir una actividad de degradación o secuestro de ARNm intensa

y sólida, que a su vez significa que hay una fuerte regulación epigenética de la expresión génica. Por tanto, la importancia de los *P-bodies* detectables microscópicamente no debería pasarse por alto: la formación de estos acúmulos podría afectar a la traducción y/o a la degradación de alguna subpoblación de ARNm, o podría ser importante bajo ciertas condiciones, habiéndose relacionado su desregulación con ciertos tumores <sup>[110, 130]</sup>.

La composición y cualidades de los *P-bodies* pues, apuntan a que estos orgánulos son auténticas factorías que controlan el ciclo del ARNm al jugar un papel capital en su almacenamiento y degradación. La célula necesita vigilar si aparecen ARNm defectuosos y deshacerse de ellos, asegurarse de que los ARNm codificantes de citoquinas proinflamatorias no son una causa perpetua de inflamación, y finalmente, silenciar o reprimir temporalmente la traducción de varios genes usando miARN y ARN pequeños de interferencia <sup>[131-133]</sup>. No obstante, para ello no siempre se precisa la aparición de la tradicional estructura de un orgánulo al uso. Y este último dato aporta más preguntas que respuestas.

### 1.7.2. Concepto y función de los gránulos de estrés.

Los GE son otro tipo de gránulo de RNPM relacionados dinámicamente con los *P-bodies*. Los GE, como su nombre indica, aparecen en condiciones estresantes e implican una parada en la traducción, dado que la célula puede necesitar adaptar su metabolismo a las nuevas condiciones, e iniciar un programa diferente. Bajo condiciones normales, los ARNm, tras emerger del núcleo, se unirían a factores de iniciación (p. ej., eIF4E o eIF2 $\alpha$ ) y a subunidades ribosómicas 40S, para formar el llamado complejo de iniciación de la traducción. En cambio, bajo condiciones de estrés, estos complejos de iniciación se salen de la vía que parecía llevarles a una traducción inminente, y se unen a otras proteínas específicas, agregándose en forma de GE (Figura 12). Ciertas proteínas con capacidad de unión al ARN como TIA-1, TIAR y G3BP se consideran componentes primordiales de los GE, todas ellas con dominios que inducen el ensamblaje entre sí <sup>[134]</sup>. La fosforilación de los factores de iniciación por quinasas celulares como PKR es la vía mejor caracterizada para inducir GE, pues una vez fosforilados éstos, dejan de poder formar parte del complejo de iniciación, aunque se han descrito otras vías alternativas <sup>[135, 136]</sup>. La presencia de los factores de iniciación y de las subunidades ribosómicas 40S

son exclusivas de los GE, y claramente diferenciales de los *P-bodies*. Por otro lado, algunas proteínas como Dcp1 o GW182 son exclusivas de los *P-bodies* [136].

### 1.7.3. Interacciones entre *P-bodies* y gránulos de estrés.

Como podría parecer lógico, existe una interacción duradera entre ambos orgánulos en todas las células eucariotas. Aparte de compartir ciertas propiedades (ambos forman focos en un equilibrio dinámico), hay algunas proteínas comunes entre ellos (p. ej., Xrn-1 o rck/DDX6). De hecho, ambos orgánulos son capaces de fundirse bajo ciertas condiciones. Pero las proteínas no son lo único intercambiable entre ellos: el ciclo del ARNm es impresionantemente complejo, y puede haber un intercambio desde los *P-bodies* hasta los GE y viceversa, con incluso su retorno a la vía de la traducción (Figura 12) [136, 137]. Sorprendentemente precisos, todos estos procesos tienen lugar a través de interacciones fisicoquímicas competitivas como plegamientos proteicos y ciclos de fosforilación-desfosforilación [124, 125, 138].

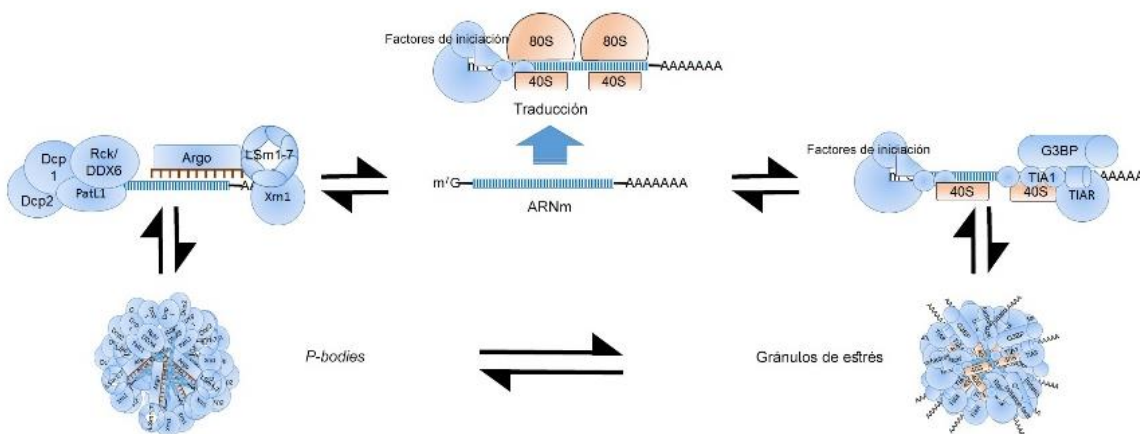


Figura 12. Composición de los *P-bodies* y gránulos de estrés y equilibrios entre los diferentes estados de sus componentes.

### 1.7.4. Cómo el VHC “juega” con *P-bodies* y gránulos de estrés sin quemarse.

Resulta como mínimo sorprendente que un virus como el VHC, cuyo ARN está previsto que se traduzca como si de un ARNm se tratase, use partes de una maquinaria diseñada precisamente para degradar y secuestrar ARNm. Para comprender esta aparente paradoja, es preciso revisar la evidencia actual con algo más de profundidad.

El VHC, como virus ARN (+) que es, usa su ARN tanto para la traducción como la replicación [26, 30]. Sin embargo, como ambos procesos son mutuamente excluyentes, Tesis doctoral – “Nuevos factores del hospedador en la fisiopatología y la respuesta al tratamiento antiviral de la infección por el virus de la hepatitis C”.

este ARN necesita intercambiarse entre los dos estados <sup>[139]</sup>. Un trabajo pionero mostró *in vitro* que el VHC necesita las proteínas rck/DDX6, LSM1-7 y PatL1 de los *P-bodies* para su traducción eficiente, sin oponerse a la posibilidad de que pudiesen usarse simultáneamente en la replicación <sup>[140]</sup>. El noqueado de estas proteínas primordiales de los *P-bodies* dificultó específicamente la traducción del VHC y disminuyó el ARN vírico intracelular. Es interesante cómo los anillos reconstituidos de LSM1-7 se unían a sitios específicos de las UTR 5' y 3'. De hecho, era necesaria la unión simultánea a ambos extremos. Conociendo el papel tan importante de UTR 5' en la traducción del ARN del VHC, los hallazgos parecen cobrar sentido. IRES, situado en el extremo 5', se une directamente a la subunidad ribosómica 40S y así puede comenzar a formar el complejo de iniciación de la traducción antes de que se le una ningún factor de iniciación. Sólo posteriormente se unen factores de iniciación como eIF3, con la adhesión final de la subunidad ribosómica 80S y traducción, una vez que el proceso ya ha arrancado. Para lograr esto, y teniendo en cuenta que para todas las fases del ciclo, el VHC necesita de la “colaboración” del hospedador, IRES seguramente requiera componentes de la célula para ayudarse (proteínas de los *P-bodies*).

Otros estudios han obtenido resultados congruentes al encontrar ciertas asociaciones entre el ciclo del VHC y la maquinaria de degradación del ARNm. Se ha postulado que el VHC utiliza algunas proteínas como Argonauta 1-4, Dicer y DDX6 (también conocido como Rck/p54) en su propio beneficio <sup>[141-144]</sup>. Estos resultados, al igual que lo anterior, podrían ser consistentes con el papel positivo que tiene el microARN miR122 en la replicación, dado que estas proteínas están implicadas en las vías de degradación mediadas por miARN. De hecho, las UTR son regiones con una estructura secundaria compleja, muy rica en lazos y pseudonudos, y la unión de dos moléculas de miR122 en UTR 5' permite la estabilización del genoma para su traducción, con un probable papel en la protección de dicho genoma <sup>[25, 30, 145]</sup>. Esta interacción podría estar mediada por LSM1, independientemente de DDX6 <sup>[146, 147]</sup>. Por otro lado, algunos componentes típicos de los *P-bodies* como Dcp2 no parecen requerirse para el ciclo del VHC. Esto sugiere que el VHC posee una especificidad extremadamente refinada a la hora de aprovecharse de las maquinarias del hospedador. Otras como Xrn-

1 aún son controvertidas. Algunos autores la han descrito como requerida por el VHC mientras que otros han hallado lo contrario <sup>[140, 148]</sup>.

En cuanto a la configuración espacial de los *P-bodies* en el ámbito de la infección por el VHC, se ha demostrado que la infección altera la composición de los mismos. En un trabajo reciente se encontró que la infección por VHC redujo la abundancia y tamaño de los *P-bodies* que contenían PatL1, LSm1 y rck/DDX6 <sup>[149]</sup>. Las mencionadas proteínas se relocalizaron difusamente por el citoplasma. Estas alteraciones se restablecieron al bloquear la replicación del VHC mediante un inhibidor de NS5B, pero sólo parcialmente al usar puromicina, un fármaco que habitualmente incrementa el número y tamaño de los *P-bodies* por inhibir la síntesis proteica (en el paso de la traducción de ARNm a proteína). Esto sugiere que el VHC es la principal fuerza impulsora de las alteraciones en los *P-bodies* durante la infección. Es interesante que la transfección con un replicón subgenómico produjo el mismo efecto que la infección con VHCcc. Todos estos hallazgos confirmaron que el efecto del VHC en los *P-bodies* depende principalmente de las fases de traducción y replicación. Otro resultado interesante es que ni el número ni el tamaño de los *P-bodies* que contenían Dcp1 pareció afectarse por la infección, de igual modo que se había visto previamente con Dcp2. Finalmente, el mismo estudio demostró que la integridad espacial de los *P-bodies* no es necesaria para el ciclo del VHC, dado que la disrupción de los mismos al deplecionar Rap55 no tuvo efecto sobre la producción viral (medida mediante expresión de NS5A).

Como los GE tienen funciones similares a los *P-bodies*, y siendo que ambos orgánulos pueden interactuar, parece lógico que el efecto de reclutamiento del VHC no esté limitado a los *P-bodies*. Por su parte, una cantidad ya importante de pruebas indica que otros virus diferentes al VHC manipulan los GE para controlar la respuesta celular de estrés a la infección <sup>[113, 119, 150]</sup>. En efecto, algunos estudios han mostrado que numerosos componentes de los GE son secuestrados por el VHC. DDX3 parece redistribuirse a ciertos lugares del citoplasma donde se puede encontrar la proteína core, incluyendo las GL <sup>[148, 151, 152]</sup>. Esta interacción con core es de significado incierto, dado que no parece relacionada con la replicación, que sería de hecho el papel de DDX3. Algo similar puede ocurrir con la proteína rck/DDX6 de los *P-bodies* <sup>[148, 152]</sup>.

A estas alturas, uno podría tener por hipótesis que la interacción entre VHC y GE es análoga a la que se da entre VHC y *P-bodies*, usando algunas proteínas para conmutar entre los estados de replicación y traducción. Por el contrario, la realidad puede ser más compleja de lo esperado e incluso más paradójica. Dos estudios concurrentes y de gran frescura han venido a ampliar nuestras miras en este aspecto <sup>[153, 154]</sup>. Parece que la replicación del VHC induce GE, especialmente en presencia de IFN, sin aumentar la cantidad total de las proteínas que los componen. Tal inducción se da mediante la ya mencionada PKR. PKR es un gen estimulado por IFN (ISG), siendo la infección por el VHC el estímulo inicial para producir IFN. Sin embargo, el VHC por sí mismo puede ser suficiente para inducir la fosforilación de PKR mediante NS4A y E2, y por tanto, para estimular directamente la formación de GE <sup>[101, 102]</sup>. La inducción de GE por la vía de PKR detiene la traducción celular y reduce su capacidad de división. Teóricamente, si el ciclo celular y la traducción se enlentecen, entonces la traducción del VHC también se vería dificultada, y la infección podría frenarse. El hallazgo interesante viene cuando esta parada parece afectar también a los propios ISG, de tal modo que la expresión de las proteínas defensivas estimuladas por IFN se disminuiría en las células infectadas, en tanto sus ARNm se acumulasen sin traducir dentro de los GE <sup>[153, 155]</sup>. Así, hipotéticamente podría haber una manera “correcta” de detener la traducción junto con una “incorrecta”. La manera “correcta” estaría inducida por IFN y la “incorrecta” estaría directamente inducida por el VHC. El IFN dispara la formación de GE en las células infectadas por el VHC, pero de algún modo logra también reducir cuantiosamente su muerte. El VHC *per se* induce una potente respuesta de GE, pero también una alta mortalidad celular, coincidiendo con una parada en la traducción y una disminución de la división celular <sup>[154]</sup>. De hecho, las células infectadas sin GE sobreviven más que las que generan GE. Hay que aclarar que los efectos del VHC aislado y del IFN se pueden estudiar por separado porque las líneas celulares usadas habitualmente como modelo (p. ej., Huh-7) poseen una respuesta de IFN defectuosa <sup>[156]</sup>. Por tanto, se puede observar el efecto del VHC mediante infección, y posteriormente, estimular la respuesta a IFN añadiendo IFN exógeno.

Resulta muy intrigante cómo pueden sobrevivir las células a un estado de inhibición de la traducción, aunque éste estuviese producido por IFN y por lo tanto,

fuese beneficioso. La respuesta incluye la dimensión temporal: la inducción de GE es muy dinámica por tratarse de gránulos de ARN. De este modo, la formación de los mismos está constantemente oscilando debido a reguladores específicos de la fosforilación de PKR, como GADD34. Mientras que la oscilación inducida por el VHC parece ser de baja frecuencia, el IFN resulta incrementarla drásticamente, sugiriendo dos vías diferenciadas para la inducción de los GE, en consonancia con lo descrito más arriba <sup>[154]</sup>.

Finalmente, parece existir una interacción tripartita entre *P-bodies*, GE y el VHC, especialmente en presencia de IFN. Este fenómeno aún no se comprende bien y podría reflejar una potente respuesta al estrés y una profunda reprogramación como reacción contra el VHC, más que un simple secuestro de proteínas por el virus <sup>[154]</sup>.

Hasta aquí se ha visto que la relación del VHC con los *P-bodies* y GE es evidente y muy compleja, probablemente fruto de una larga evolución conjunta. No obstante, al margen de la presente tesis, sólo existe un trabajo que estudie los *P-bodies in vivo* (ratones) <sup>[157]</sup>, y por supuesto, todos los estudios de infección publicados se han llevado a cabo *in vitro*. No se puede encontrar ningún trabajo que se haya lanzado a estudiar estas dinámicas en seres humanos, probablemente por su dificultad técnica y por el esfuerzo de integración traslacional que implica. Dado que no siempre existe una correlación perfecta entre los modelos *in vitro* y los procesos *in vivo*, se impone una validación en pacientes reales que pueda dotar de utilidad a todo este conocimiento acumulado.



### 1.8. El interferón-lambda 4.

- Los interferones (IFN) son moléculas antivirales con importantes funciones inmunes, especialmente innatas. El IFN- $\alpha$  ha venido siendo la base del tratamiento contra el VHC durante décadas.
- Existen diversos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que afectan a la respuesta contra el VHC relacionada con el IFN, tanto espontánea como después del tratamiento.
- Aunque los SNP relacionados con el IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) se han usado durante años, nuevos SNP y el IFN- $\lambda$ 4, un nuevo tipo de IFN, han revolucionado este campo y redondeado al fin la fisiopatología de la respuesta inmune innata al VHC.
- Antes de la presente tesis, se desconocía el papel de estos nuevos SNP en la respuesta al tratamiento con IFN en pacientes trasplantados.

Al menos desde que el IFN- $\alpha$  comenzó a usarse para tratar el VHC en 1989-1990, cualquier hepatólogo sabe que el IFN (o mejor dicho, los IFN) posee un papel clave en la fisiopatología de la hepatitis C <sup>[158]</sup>. No en vano, aparte de estudiarse con profusión su mecanismo, el IFN se ha venido utilizando en el tratamiento habitual de la hepatitis C hasta hace apenas 2 años <sup>[159]</sup>.

#### 1.8.1. Concepto de interferón.

Los IFN son moléculas antivíricas que sirven para reaccionar ante infecciones producidas por los virus, formando parte de la inmunidad innata de las células infectadas e incluso de las circundantes <sup>[103, 160]</sup>. Los IFN pertenecen a la familia de las citoquinas de clase II, estando emparentados con la IL-10 y la IL-22 <sup>[161]</sup>. Los mamíferos poseen 3 clases diferentes de IFN: tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ), tipo II (IFN- $\gamma$ ) y tipo III (IFN- $\lambda$ ). Los efectos del IFN de tipo II son limitados. Sin embargo, los IFN de tipo I y III inducen potentes respuestas antivirales capaces de regular al alza la expresión de cientos de ISG. La diferencia funcional más importante entre estos últimos dos tipos es que mientras cualquier célula nucleada responde a los IFN de tipo I, los de tipo III muestran una restricción a los tipos histológicos más expuestos a infecciones víricas, típicamente mucosas. Así, la respuesta producida por los IFN de tipo I suele estar más reservada para la fase aguda y es más costosa para el organismo, mientras que la producida por los IFN de tipo III es

ligeramente más lenta y sobre todo, más restringida, siendo ambas más o menos complementarias <sup>[102, 103]</sup>. Los IFN de tipo III o familia del IFN- $\lambda$ , se subdividen en 4 miembros: IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 y recientemente, IFN- $\lambda$ 4. Hasta hace pocos años, su nomenclatura era diferente: IL-29, IL-28A e IL-28B para los tres primeros, respectivamente. Por este motivo, aún hoy es común entre los clínicos el hablar de la IL-28B cuando se refieren al IFN- $\lambda$ 3. Para finalizar, el receptor del IFN- $\lambda$  se compone de la cadena 1 del receptor de IFN- $\lambda$  (IFN- $\lambda$ R1) y de la cadena 2 del receptor de IL-10 (IL-10R $\beta$ , que se comparte con otras citoquinas, como puede suponerse por su nombre).

### 1.8.2. Visión global resumida de la inmunidad innata contra el VHC. Secreción de los interferones.

Una vez comienza el ciclo del VHC, la célula infectada es capaz de detectarlo como ajeno gracias a receptores de patrones moleculares de patógenos. El patrón detectado en el caso del VHC es el ARNb, ácido nucleico que no se encuentra de manera natural en los mamíferos <sup>[102, 160]</sup>. Como se ha mencionado previamente, RIG-I y TLR-3 son los sensores más importantes encargados de detectar la presencia de ARNb del VHC y desencadenar una respuesta basada en IFN. Aun así, otras moléculas como la ya conocida PKR pueden funcionar como receptores “putativos”, y contribuir a desencadenar la respuesta. RIG-I activa la vía del IFN a través de MAVS. El TLR-3 lo hace a través de TRIF. Dichos adaptadores MAVS y TRIF acaban activando tras varios pasos los factores de transcripción IRF-3 y NF- $\kappa$ B (factor regulador de interferón-3 y factor nuclear- $\kappa$ B, respectivamente), que son los que realmente se unen al ADN celular y hacen comenzar la producción de IFN. Como se ha visto [más atrás](#), la proteasa vírica NS3-4A cataliza la digestión de MAVS, inhibiendo así la señalización de RIG-I y de PKR, y también cataliza el clivaje de TRIF, inhibiendo la del TLR-3. Por otro lado, recordemos que las proteínas E2 y NS4A regulan el grado de fosforilación de PKR, en un equilibrio de fuerzas contrapuestas, entre nocivas y beneficiosas para el virus.

En cualquier caso, una vez producidos los IFN (entre otras citoquinas), éstos actúan paracrina y endocrinamente a través de receptores específicos en los tipos celulares ya comentados, además de actuar en células profesionales del sistema inmune. Estas últimas pueden formar parte del sistema inmune innato, como las NK o las células

de Kupffer, o bien del sistema inmune adaptativo, como las células dendríticas o los linfocitos T o B.

No entra dentro de los objetivos de esta tesis el estudio de la inmunidad adaptativa, aunque ésta presenta un papel importante en la fisiopatología y patocronia de la infección por VHC, y de hecho, la inmunidad innata es de una importancia capital para la adecuada inducción (*priming*) de la adaptativa <sup>[102, 162]</sup>.

### 1.8.3. Los polimorfismos del interferón-lambda 3 (IL-28B) y sus implicaciones.

Los IFN de tipo I y III actúan a través de receptores diferentes, pero las vías intracelulares implicadas son comunes en gran medida, de tal manera que ambos acaban induciendo la expresión de ISG mediante el complejo ISGF-3 (compuesto por STAT-1, STAT-2 e IRF-9), previa fosforilación de quinasas, en la conocida como vía JAK-STAT. Parece que los IFN de tipo III (IFN- $\lambda$ ) son especialmente importantes en la fisiopatología de la infección por el VHC. En 2009 vieron la luz varios estudios independientes que han revolucionado la historia del tratamiento y estudio del VHC, al descubrir que dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) estaban muy asociados con la probabilidad de aclaramiento espontáneo del VHC en fase aguda, y que también lo estaban con la probabilidad de respuesta al tratamiento con PEG-IFN y RBV <sup>[62, 163, 164]</sup>. Tanto es así que al poco tiempo ya se estaban empleando en la práctica clínica habitual, con el fin de ahorrar molestos y peligrosos efectos adversos del tratamiento. Estos SNP se sitúan en el brazo largo del cromosoma 19, aguas arriba de la región codificante del IFN- $\lambda$ 3 (o IL-28B), y el código de referencia de los dos más importantes es rs12979860 y rs8099917. En concreto, el SNP rs12979860 se encuentra muy cerca de la región codificante del IFN- $\lambda$ 3, unas 3 Kb aguas arriba ([Figura 14](#)). Por su parte, el SNP rs8099917 está a unas 8 Kb aguas arriba de la región codificante del IFN- $\lambda$ 3 y a unas 16 Kb de la región codificante del IFN- $\lambda$ 2 ([Figura 14](#)). Para rs12979860, los alelos con la base nitrogenada C (citosina) están relacionados con un mejor pronóstico, mientras que los T (timina) lo están con una peor evolución. Para el rs8099917, los alelos favorables son los T y los desfavorables son los G (guanósina). Por tanto, un paciente con el genotipo CC para rs12979860 tiene mejor pronóstico que con genotipos CT o TT. De igual manera, un paciente con genotipo TT de rs8099917 tiene mejor pronóstico que con genotipos TG o GG. Además, la distribución alélica varía según la raza, lo cual explicaba la peor

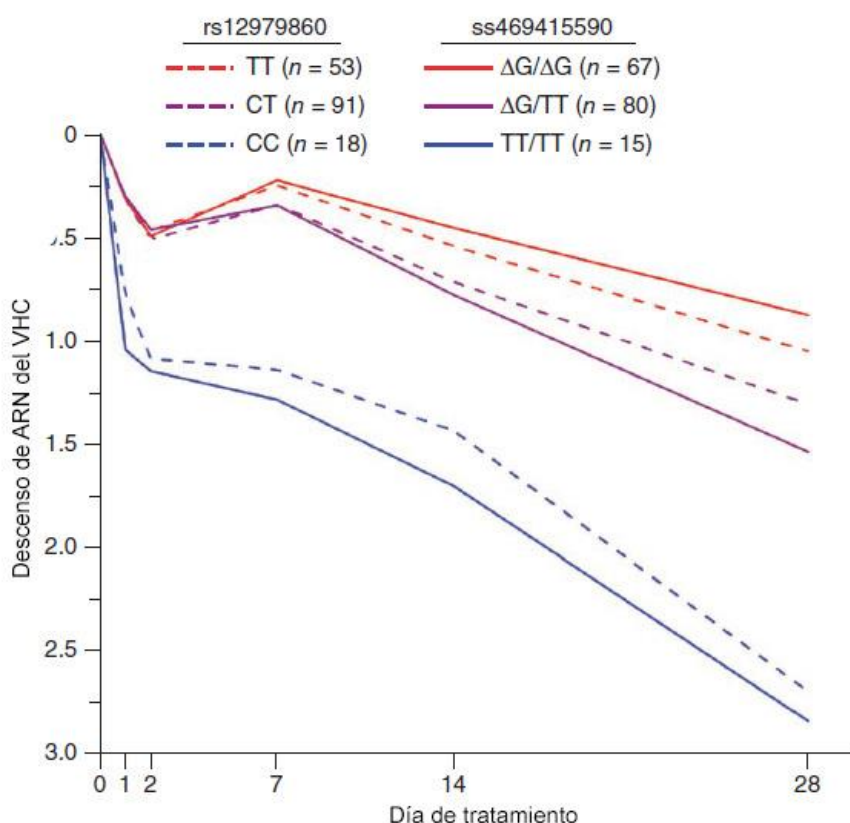
respuesta al PEG-IFN y RBV de los pacientes de origen africano, pues éstos tienen predominancia de alelos desfavorables <sup>[62]</sup>. Por otro lado, rs8099917 parecía tener más potencia predictiva para los pacientes de origen asiático con respecto a rs12979860 <sup>[164]</sup>. Este hecho no dejaba de ser extraño, pues cabría esperar un desequilibrio de ligamiento perfecto entre ambos SNP, si es que ambos correspondían a la misma causa subyacente.

Tras algún trabajo fallido <sup>[165]</sup>, los genotipos de dichos SNP se lograron relacionar con los niveles de expresión de IFN- $\lambda$ 3 <sup>[166]</sup>, llevando a la conclusión de que podrían encontrarse en la región promotora de IFNL3. Sin embargo, tras la publicación de un número creciente de trabajos sobre el valor predictivo de estos SNP y sobre su posible funcionamiento, el mecanismo exacto no parecía estar demostrado de manera convincente, limpia y completa. Lo que sí estaba claro es que la respuesta inmune innata se asociaba a estos SNP, hecho que se podía comprobar a través de los niveles de expresión de los ISG. Antes del descubrimiento de estos SNP se sabía que los niveles de ISG intrahepatocitarios influían poderosamente sobre la respuesta al tratamiento con PEG-IFN + RBV <sup>[167]</sup>. Los hígados en los que el VHC inducía unos niveles altos de ISG pretratamiento se asociaban a una peor respuesta, pues no se lograba aumentar esa inducción con el tratamiento, hecho que parecía estar también relacionado con el genotipo del VHC. Los hallazgos se encontraban confinados al hígado, pues los monocitos de sangre periférica (PBMC) no mostraban estos hallazgos. Posteriormente, en una época de gran predicamento de los SNP del IFN- $\lambda$ 3, se demostró una alta correlación entre el genotipo de rs12979860 y los niveles de expresión de ISG intrahepatocitarios medidos por ARNm (especialmente de MxA), que predecían de manera muy precisa la respuesta al tratamiento. De hecho, en el análisis multivariado, los niveles de expresión de ISG resultaron ser los únicos que mantuvieron significación estadística en su asociación con la respuesta, más que el genotipo del SNP. Además se observó que dichos ISG se expresaban de manera inversa en las células de Kupffer, por lo que claramente existían mecanismos inversos en la inmunidad innata no profesional con respecto a la profesional <sup>[168]</sup>. En definitiva, los niveles de expresión de ISG en el hígado eran los factores predictivos más potentes para la respuesta al tratamiento con PEG-IFN + RBV, hecho no útil en la práctica clínica habitual, pues medirlos implicaba biopsiar a todos los pacientes, y asimismo ya se podía vislumbrar el advenimiento de los

tratamientos sin IFN. Por otro lado, aunque los SNP del IFN- $\lambda$ 3 eran casi igual de potentes y muy útiles a nivel práctico, persistían muchas incógnitas acerca del mecanismo completo por el cual éstos influían en el aclaramiento del VHC (bien espontáneo, bien con biterapia). Conocer a fondo dicho mecanismo podía ayudar a encontrar nuevas dianas terapéuticas, o como mínimo, a predecir mejor la respuesta al tratamiento.

### 1.8.4. El interferón-lambda 4: la pieza que faltaba.

En el año 2013, Prokunina-Olsson *et al.* publicaron un artículo que abrió una nueva línea de investigación en el campo de los IFN y ayudó a encontrar respuestas razonablemente definitivas a las incógnitas reseñadas en el apartado anterior [37]. En dicho artículo se estudió la expresión –transitoria- de una región aguas arriba del gen IFNL3. Esta región comprendía un SNP sobre el que no se había puesto atención antes: el ss469415590, luego nombrado definitivamente como rs368234815, y que más que un



**Figura 13.** Descenso mediano en los niveles de ARN del VHC (unidades internacionales por mL en  $\log_{10}$ ) en pacientes de raza negra durante el primer mes de tratamiento con PEG-IFN + RBV, según su genotipo de los polimorfismos rs12979860 y ss469415590 (rs368234815). Las diferencias entre las rectas de rs12979860 y ss469415590 (rs368234815) son estadísticamente significativas (Fuente: Adaptado de Prokunina-Olsson *et al.*, 2013)

polimorfismo de un solo nucleótido, es un polimorfismo de dos nucleótidos. No obstante, y por mor de simplificar, lo denominaremos SNP, lo mismo que han hecho los textos científicos publicados hasta la fecha. El rs368234815 se encontraba en desequilibrio de ligamiento con rs12979860, y resultó relacionarse con el aclaramiento del VHC con una intensidad ligeramente mayor, especialmente en pacientes de origen africano. Los autores demostraron que rs368234815 tenía la llave para la expresión de un nuevo tipo de IFN: el IFN- $\lambda$ 4. La causa parecía ser que el alelo silvestre de rs368234815 consistía en una pareja de T (TT), y que la mutación que definió el SNP produjo una delección de la primera T más una sustitución T $\rightarrow$ G de la segunda T ( $\Delta$ G). La interesante consecuencia de pasar de TT a  $\Delta$ G fue que al correrse el marco de lectura en una posición (independientemente de la sustitución) se permitía la expresión de un gen subyacente que estaba interrumpido por TT. Este gen era precisamente IFNL4, que permanecía latente como un pseudogen por encontrarse TT en el exón 1. No se quedaban ahí las novedades, pues al contrario de lo que parecía lógico, el alelo favorable era el silvestre TT. En efecto, el genotipo  $\Delta$ G/ $\Delta$ G, que permitía la expresión de IFN- $\lambda$ 4, se asociaba con una peor respuesta al tratamiento, y el genotipo TT/TT, que eliminaba la proteína, se asociaba con una mejor respuesta, quedando la heterozigosis TT/ $\Delta$ G en un riesgo intermedio (Figura 13). Por lo tanto, el IFN- $\lambda$ 4 debía de ser un IFN con efectos deletéreos, al menos contra el VHC, si bien la transfección de células de hepatoma HepG2 con un constructo de IFNL4 estimuló la expresión de ISG vía JAK-STAT. Poco después, el IFN- $\lambda$ 4 sintético mostró actividad antiviral potente en células de epitelio humano infectadas con un coronavirus, señalizando a través del receptor de IFN- $\lambda$  [169]. El hecho de que rs12979860 quedase situado en un intrón de IFNL4, junto con la menor potencia que siempre había mostrado rs8099917 en pacientes de raza blanca y negra (que ahora coincidía con que rs8099917 se encontraba a una mayor distancia física de rs368234815), hacían pensar que el nuevo SNP era realmente el funcional, y que los otros dos no eran sino marcadores subrogados debido al desequilibrio de ligamiento (Figura 14). Pronto se vio en otro artículo que rs368234815 también tenía más potencia predictiva de respuesta al tratamiento en una cohorte de pacientes de raza blanca, y seguidamente se comprobó en un tercer estudio que se asociaba con el aclaramiento espontáneo del VHC [170, 171]. Casi simultáneamente, se vio que su correlación con rs8099917 era muy alta en pacientes japoneses, teniendo similar valor predictivo de

respuesta al tratamiento en dicha población por su alto desequilibrio de ligamiento <sup>[172]</sup>. Y no sólo se estudió en el contexto del VHC. El genotipo desfavorable parecía influir negativamente en la reactivación del CMV en pacientes inmunodeprimidos, aunque no era el caso con el herpes oral o genital <sup>[173-175]</sup>.

El trabajo de Prokunina-Olsson *et al.*, pese a suponer un auténtico hito, no logró demostrar la presencia natural de la proteína IFN- $\lambda$ 4, viéndose obligado a trabajar únicamente con haplotipos de transcritos de ARNm, y dejó una gran cantidad de preguntas científicas sin resolver. De hecho, un estudio realizado prácticamente en paralelo por otro equipo, demostró que el genotipo de rs368234815 se correlacionaba con los niveles de expresión de IFN- $\lambda$ 3 e IP-10 (proteína inducible por IFN- $\gamma$  10) intracelulares de PBMC *ex vivo* de pacientes infectados por VHC, y que efectivamente, lo hacía mejor que rs12979860 <sup>[170]</sup>. Otro artículo describió una relación entre los genotipos desfavorables TT/ $\Delta$ G +  $\Delta$ G/ $\Delta$ G, y una capacidad de degranulación linfocitaria intrahepática más débil en pacientes infectados por el VHC <sup>[176]</sup>. Pero el mecanismo que explicaba la relación entre el nuevo SNP y la eliminación del VHC seguía sin ser nada sencillo: ¿era por fin rs368234815 el polimorfismo directamente relacionado con el efecto o su relación era más indirecta de lo que parecía? De ser el IFN- $\lambda$ 4 la causa, ¿cómo podía un IFN funcional producir una respuesta disfuncional contra el VHC? ¿Inducía acaso algún tipo de saturación intracelular de ISG? ¿Entraba en competencia con los IFN de tipo I y III? ¿Su secreción era deficiente? Parte de las respuestas se encontraban ya, sin saberlo, en el artículo inicial. Este artículo había descrito más SNP en la misma región, 3 de ellos con variantes no sinónimas, que pueden encontrarse fácilmente en la figura 2 del material suplementario. Así, en 2014 se estudió en otro artículo el papel de un SNP no sinónimo muy importante situado en el gen IFNL4, con el número rs117648444, que provoca un cambio de prolina a serina en la posición 70 (Pro70Ser) <sup>[177]</sup>. Es muy llamativo que la sustitución sólo se da cuando el IFN- $\lambda$ 4 se expresa, es decir, está ligada al alelo  $\Delta$ G, lo cual habla en favor de su papel funcional. De esta suerte, y como se descubrió poco más tarde, rs117648444 induciría la producción de 2 IFN- $\lambda$ 4 diferentes: un IFN- $\lambda$ 4-P70, completamente activo, que induce altos niveles de ISG, y un IFN- $\lambda$ 4-S70 mucho menos potente. Así, rs368234815 y rs117648444 se pueden combinar en haplotipos (8 diplotipos) para estratificar a los pacientes en 3 grupos principales, a saber: aquéllos



incapaces de sintetizar IFN- $\lambda$ 4; aquéllos que sintetizan IFN- $\lambda$ 4-S70, y aquéllos que sintetizan IFN- $\lambda$ 4-P70. El primer grupo correspondería a los pacientes con el genotipo TT/TT y mejor pronóstico; el segundo grupo correspondería a los pacientes con algún alelo  $\Delta$ G de rs368234815, pero con un IFN- $\lambda$ 4 disfuncionante, y por tanto de pronóstico intermedio, y el tercer grupo se correspondería con los pacientes  $\Delta$ G/ $\Delta$ G con IFN- $\lambda$ 4 normofuncionante, siendo éstos los de peor pronóstico <sup>[178]</sup>. Parece claramente demostrado que el IFN- $\lambda$ 4 no resulta útil para luchar contra el VHC, y que a menor actividad del mismo, mejor pronóstico para el paciente, con menores niveles de ISG intrahepatocitarios. No se puede descartar un cierto papel de secreción deficiente, aunque esto sólo se ha estudiado *in vitro* <sup>[169]</sup>. Sea como fuere, pese a que rs368234815 resulta más potente para predecir la respuesta y aclaramiento espontáneo del VHC que los 2 SNP primeramente descubiertos (tanto en pacientes mono infectados como coinfectados por el VIH), esa diferencia estadística puede ser de dudosa ventaja clínica por su escasa magnitud <sup>[179, 180]</sup>. Incluso algún trabajo muestra mejores números para rs8099917 en población oriental <sup>[172]</sup>. La secuenciación concomitante de rs117648444 mejoraría la potencia de rs368234815 y afinaría la predicción, sobre todo para los pacientes orientales, si bien estos descubrimientos han llegado justamente cuando el IFN iba perdiendo protagonismo en el tratamiento del VHC.

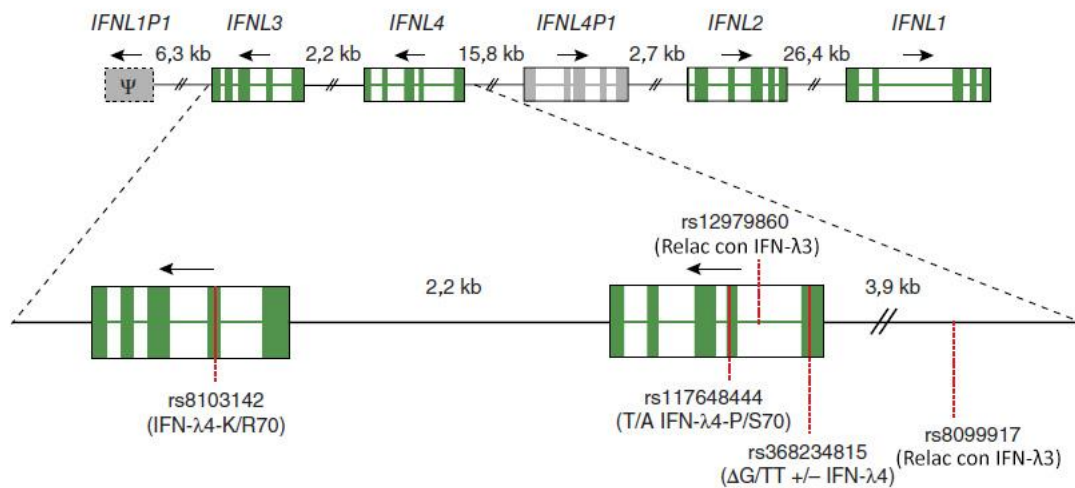
### 1.8.5. El interferón-lambda 4 desde una perspectiva evolutiva.

Hoy en día, se sabe que la familia del IFN- $\lambda$ 4 se encuentra conservada y funcional en la mayor parte de mamíferos, y que constituye un clado filogenético separado de los IFN de tipo III. Ello sugiere que los antecesores de los mamíferos poseían un gen de tipo IFNL4 junto con otro gen similar, y que a lo largo de la evolución se produjeron diversas duplicaciones del “gen similar”, dando lugar a los modernos IFNL1, IFNL2 e IFNL3, que son extremadamente variables entre especies, pero conservándose el de tipo IFNL4 (Figura 14). Y su proteína, el IFN- $\lambda$ 4, era útil. Se ha demostrado que pese a ostentar únicamente un 30% de secuencia idéntica con la de IFNL3, su capacidad de señalización permanece bien preservada y muestra signos de haber estado bajo presión evolutiva para que así fuese <sup>[40, 169]</sup>. Sin embargo, en algún momento hace unos 56.000 años, en esos humanos paleolíticos se dio la mutación que lo convirtió en un pseudogen (TT), mutación que se ha seleccionado positivamente, como demuestran los análisis



computacionales bayesianos <sup>[40]</sup>. Es decir, que el alelo que podríamos llamar verdaderamente silvestre es el  $\Delta G$ . No se trata de una delección, sino que TT es una inserción que inactiva IFNL4. Por motivos que aún se desconocen, la mutación muestra de nuevo un patrón distinto según la raza, mostrándose particularmente frecuente el genotipo favorable TT/TT en Asia, de manera paralela a los genotipos de rs12979860 y rs8099917. El matiz estriba ahora en que el gen IFNL4 parece ser el elemento subyacente que liga los dos SNP rs12979860 y rs8099917, y se correlaciona con estos dos SNP tanto mejor cuanto más nos desplazamos de África hasta Asia, pasando por Europa. Aunque en los 3 orígenes la correlación con rs12979860 es alta ( $r^2 > 0,7$ ), en los pacientes de origen africano la correlación es la más baja. Pero además, en los individuos con dicho origen la correlación con rs8099917 es muy pobre ( $r^2 = 0,008$ ). En los pacientes de origen europeo, la correlación sigue siendo mejor con rs12979860 que con rs8099917, aunque ya es mucho mejor para este segundo que en los africanos, y en el caso de los individuos de origen asiático, la correlación es alta con ambos SNP, cercana a 1 <sup>[37, 172, 181]</sup>. Es decir, rs12979860 y rs8099917 presentan una utilidad variable según la raza; rs368234815 resulta más constante con independencia del origen del paciente. Tras su salida de África, hace aproximadamente 60.000 años, el *Homo sapiens* encontró otros *Homo spp.* a su paso. Sabiendo que los europeos modernos poseen un 1,5-4% de genes de origen neandertal cuyos SNP influyen sobre su salud, y sabiendo que los aborígenes actuales de la Melanesia y Australia poseen un 3-6% de genes de origen denisovano, le resulta muy tentador al autor pensar que el enriquecimiento en el alelo TT pueda estar influido por el cruce con especies humanas actualmente extintas <sup>[182-184]</sup>. El hecho de que la frecuencia de alelos TT aumente conforme nos desplazamos desde África hasta Asia, podría apoyarlo. Este extremo, que no deja de ser hipotético, no se ha podido comprobar, pues el autor no ha encontrado secuenciada aún la región 19q13.13 en las bases de datos de ADN neandertal disponibles en línea <sup>[185]</sup>.

Cromosoma humano 19q13.13-2



**Figura 14.** Organización genómica de los IFN de tipo III y del IFNL4 en el ser humano (Fuente: Adaptado de Wack et al., 2015). "IFN": Interferón; "Relac": Relacionado.

## 1.8.6. El caso específico del TH.

Tal y como se ha comentado en profundidad en el apartado 1.5, el TH constituye un caso muy particular en el que el acervo genético del receptor convive con el acervo genético del injerto en el mismo individuo. Además, recordaremos que la posibilidad de predecir la respuesta al tratamiento con PEG-IFN + RBV es particularmente importante por el mal perfil de seguridad y eficacia en estos pacientes. Tras las publicaciones iniciales sobre los SNP rs12979860 y rs8099917 del IFN-λ3, pronto se comenzó a tratar de validar su utilidad en el caso especial del TH. Se publicaron 4 estudios muy importantes sobre este tema entre 2010 y 2011, llevados a cabo casi simultáneamente en el fragor de la competencia. Comenzaremos comentando los 3 primeros, que no obtuvieron resultados del todo homogéneos.

El primero de todos se realizó en Japón, investigando el papel de rs8099917 <sup>[186]</sup>. Además, se evaluó otro SNP (rs12980275) y mutaciones en ciertas regiones de core y NS5A del VHC, demostrándose que el genotipo de rs8099917 tanto del donante como del receptor estaban asociados con la RVS, siendo también útil el estudio de las mutaciones en core. Los mejores resultados se obtenían cuando tanto el genotipo del donante como el del receptor eran favorables (TT-TT). El segundo estudio, publicado casi simultáneamente, se centró en exclusiva sobre rs12979860, y tiene el punto fuerte de haber incluido un grupo control de pacientes sin tratar <sup>[187]</sup>. La conclusión más

importante es que el genotipo tanto del donante como del receptor resultaron estar relacionados de manera independiente con la respuesta al tratamiento basado en IFN. Además, el alelo desfavorable (TT) del receptor se relacionaba con una mayor progresión de la fibrosis al año del TH. El tercer estudio, publicado ya a principios de 2011, de nuevo estudió rs12979860. Éste coincidía con el primer estudio japonés en que la asociación clara parecía corresponder al genotipo del donante, encontrando una asociación más débil para el genotipo del receptor. Un hecho interesante de este estudio es que la asociación se dio tanto para la RVS como para respuestas rápida y precoz (a las 4 y 12 semanas de tratamiento respectivamente) <sup>[188]</sup>.

Hasta aquí, los 3 primeros estudios, que aunque no absolutamente concordantes, mostraban una influencia de los SNP del IFN- $\lambda$ 3. El cuarto estudio, publicado justo a continuación, estudiaba la influencia de ambos SNP simultáneamente (rs12979860 y rs8099917) y demostraba cómo el genotipo del receptor se relacionaba con la respuesta al tratamiento, y que la RVS aumentaba de manera significativa con la combinación donante-receptor favorables (CC para rs12979860 y TT para rs8099917) <sup>[75]</sup>.

Puede haber varias razones para estas discordancias, como por ejemplo, que los tamaños muestrales son pequeños. Sin embargo, llama la atención que ninguno de los tres primeros estudios especifique claramente el punto temporal en el que se recogieron las muestras. El cuarto estudio, a diferencia de sus predecesores, especifica con todo detalle cómo se recogieron las muestras y en qué punto de la historia natural del TH. La publicación posterior de un quinto estudio aclaratorio arroja luz al respecto, demostrando que el momento y tipo de muestra son críticos a la hora de obtener conclusiones fiables acerca de la influencia de estos SNP <sup>[189]</sup>. La clave consiste en no perder de vista que los pacientes trasplantados constituyen un organismo quimérico, como se ha venido explicando en otros apartados. El ADN genómico del receptor se puede obtener fácilmente de sus PBMC. En cambio, no siempre existe muestra disponible del donante para la extracción de su ADN. Así pues, se suelen aprovechar las biopsias hepáticas por protocolo, realizadas al cabo de un tiempo variable del TH. Con todo, dada la rápida repoblación del injerto con células del receptor, existe el riesgo de extraer ADN mixto donante-receptor de dichas biopsias, y por tanto, de hacer determinaciones erróneas. En este trabajo se demostró con claridad que las biopsias de

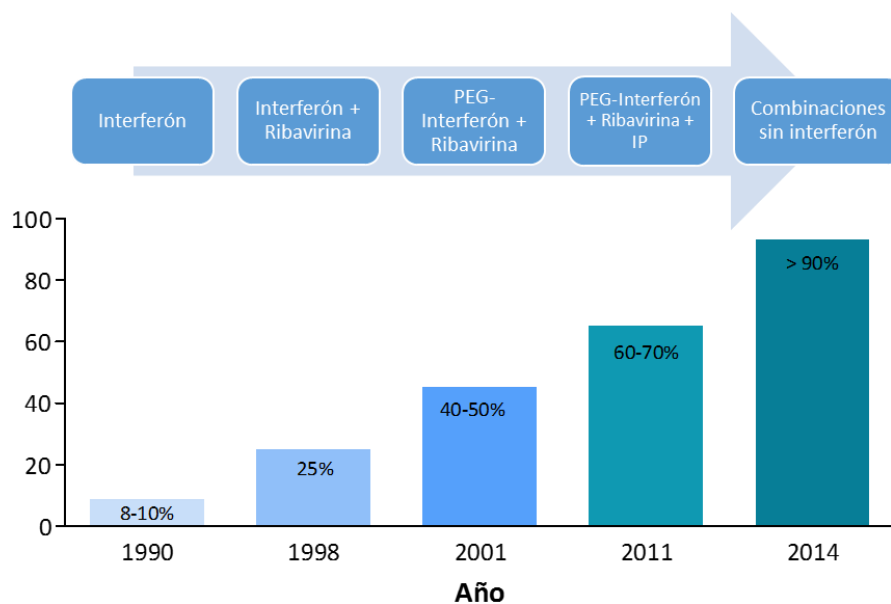
reperfusión aún eran válidas para determinar el genotipo del donante, pues se correlacionaban al 100% con los controles obtenidos de PBMC, no así las biopsias posteriores, en las que se producía un enriquecimiento de genotipos heterocigotos CT (rs12979860), producto inequívoco de la mezcla de alelos C y T secundaria al quimerismo. Por lo tanto, las conclusiones del cuarto estudio sobre la influencia de los SNP del IFN- $\lambda$ 3 parecen sólidas, dado que con seguridad no se produjo el “sesgo de la quimera” [75]. En cualquier caso, de todos estos trabajos se desprende que los SNP del IFN- $\lambda$ 3 tienen una clara influencia en la respuesta al tratamiento también en los pacientes con TH. Así pues, se hace necesario comprobar si los polimorfismos asociados al IFN- $\lambda$ 4 se comportan de manera análoga, y es importante hacerlo teniendo en cuenta las consideraciones previas acerca de la fuente de ADN del donante.

### 1.9. Los rápidos avances en el tratamiento del VHC.

- Hasta 2011-2012, el estándar de tratamiento era el PEG-IFN más Ribavirina, con bajos porcentajes de respuesta, baja tolerabilidad y mal perfil de seguridad.
- En 2011 se comercializaron los primeros antivirales de acción directa, que se utilizaban en combinación con PEG-IFN y Ribavirina, con mejoras en la eficacia, pero más bajo perfil de tolerabilidad y seguridad.
- A partir de 2014 se empezaron a comercializar sucesivamente más antivirales de acción directa, posibilitando regímenes sin IFN, con alta eficacia y buen perfil de tolerabilidad y seguridad.

Una revisión pormenorizada de los tratamientos del VHC desde sus inicios es materia suficiente como para una obra monográfica, y en cualquier caso, quedaría fuera del contexto de este trabajo. De todas maneras, es ahora, tras la exposición pormenorizada de todo el ciclo del VHC, cuando cobra sentido completo hablar de su tratamiento y mecanismos del mismo.

El comienzo de esta tesis se gestó en un momento de la Medicina en el que las terapias basadas en IFN eran la regla, y aunque se vislumbraba un futuro cercano sin



**Figura 15.** Evolución de los estándares de tratamiento y sus correspondientes mejoras en el porcentaje de respuesta virológica sostenida (Fuente: adaptado de Webster et al., 2015). "IP": Inhibidor de la Proteasa.

IFN, una porción sustancial de los pacientes, incluyendo el ámbito del TH, parecía abocada a tratarse con IFN aún durante unos años. En este contexto, seguía siendo fundamental la búsqueda de factores predictivos de respuesta y nuevas dianas. Sin embargo, lo ocurrido durante la publicación de los resultados y redacción de la tesis corresponde exactamente a un momento histórico de cambio de paradigma, que se ha acelerado de manera prodigiosa. Afortunadamente, el uso de regímenes basados en IFN parece hoy en día algo del pasado, al menos en el mundo desarrollado, y los pacientes trasplantados no son una excepción. No obstante, parece importante comenzar por el principio de la historia:

### 1.9.1. Terapias basadas en IFN.

Tal y como atestigua la correspondiente guía de manejo clínico de la *European Association for the Study of the Liver* (EASL), el estándar de tratamiento hasta 2011 era el PEG-Interferón, o Interferón pegilado (PEG-IFN) más Ribavirina (RBV) <sup>[159]</sup>. Con esta combinación se lograba una RVS media del 60% en pacientes inmunocompetentes, aunque en el caso del genotipo 1, ésta era inferior al 50%. Como se ha apuntado en el apartado referente al TH, ese régimen podía ser mal tolerado y presentaba complicaciones potencialmente mortales, sobre todo en pacientes con enfermedad hepática avanzada y/o TH. En este ámbito, resultaba fundamental poder predecir la respuesta para poder ahorrar acontecimientos adversos, tal y como se ha explicado en la sección anterior <sup>[75, 186-188]</sup>.

En 2011 comenzaron a utilizarse los primeros antivirales de acción directa (AAD), esto es, Boceprevir y Telaprevir. Ambos AAD eran inhibidores de NS3 de primera generación y debían administrarse junto con PEG-IFN y RBV, en la conocida como triple terapia contra el VHC <sup>[190, 191]</sup>. Aunque se logró elevar la RVS en aproximadamente un 20% en el mejor de los casos, había importantes problemas, como el aumento de los efectos adversos de la propia terapia doble, la restricción al genotipo 1, o el gran precio.

### 1.9.2. Terapias libres de IFN.

Como bien se ha podido apreciar, el ciclo del VHC es muy complejo, y dispone de numerosas “patas” con las que apoyarse en caso de perder puntos de apoyo. Esto representa una ventaja adaptativa. De hecho, los regímenes actuales de tratamiento se

ven obligados a incluir diferentes fármacos simultáneos apuntando a distintas dianas, pues bloqueando sólo una diana no se logra erradicar la infección: habrá otras vías que compensen rápidamente, o surgirán con facilidad mutaciones de resistencia. Aunque cualquier paso del ciclo es susceptible de inhibirse por la parte del virus o por la del hospedador, las dianas dependientes del virus son actualmente las más importantes.

Aun cuando ya se estaban administrando en forma de ensayos clínicos y uso compasivo, hasta 2014 no se comenzaron a aprobar en fase IV los llamados nuevos AAD, con Sofosbuvir (SOF) a la cabeza. Si bien los primeros ensayos clínicos hacían uso de SOF con PEG-IFN y RBV, pronto surgieron más AAD con los que ir configurando las primeras terapias sin IFN por combinación entre ellos. Hoy en día hay una razonable oferta de AAD, con inhibidores de NS5B como SOF y Dasabuvir, de NS5A como Daclatasvir, Ledipasvir, Ombitasvir, o los próximos Elbasvir y Velpatasvir; de NS3 de primera generación como Simeprevir, o de nueva generación como Paritaprevir o el inminente Grazoprevir. Todos estos fármacos se pueden combinar con RBV en función de las características del paciente. Aunque dicha combinación se hace a costa de más acontecimientos adversos, éstos suelen ser leves, especialmente si no se trata de pacientes TH. Con los nuevos regímenes sin IFN, los porcentajes de RVS han ascendido a más del 90% en la mayor parte de los pacientes (en los casos más favorables se acercan al 100%), y aún están por venir nuevos fármacos que permanecen en ensayo clínico <sup>[192-194]</sup>. Pese a las excelentes noticias, los altísimos precios son aún un problema importante como para implantar estos tratamientos a nivel global, y están surgiendo nuevos contratiempos como la posibilidad de resistencias virales, o efectos adversos absolutamente desconocidos <sup>[195, 196]</sup>.

### 1.9.3. Otras dianas terapéuticas.

Hasta aquí se ha hablado sólo de dianas terapéuticas víricas. Sin embargo, como se ha fundamentado en anteriores apartados, los factores del hospedador que entran en juego son fundamentales y muy numerosos. Es por esto que el ciclo vírico puede también inhibirse utilizando cualquiera de estas dianas propias del cuerpo humano. De hecho, todo tratamiento basado en PEG-IFN utiliza, como mínimo en parte, dianas del hospedador. La [Tabla 1](#) muestra un resumen de los fármacos desarrollados hasta la fecha con eficacia probada al menos en modelos experimentales *in vivo* <sup>[197]</sup>:

Categoría	Diana	Compuesto	Etapas de desarrollo
Inhibidores de la entrada	CD81	Acm	Modelo de ratón
	SRB1	Acm	Modelo de ratón
		ITX-5061	Fase 1
	CLDN1	Acm	Modelo de ratón
	EGFR	Erlotinib	Fase 1/2
	NPC1L1	Ezetimiba	Modelo de ratón
	Endocitosis/fusión	Silimarina/silibinina	Fase 2/3
		Cloroquina	Fase 4
Inhibidores de la traducción	miR122	Miravirsén	Fase 2
Inhibidores de la replicación	miR122	Miravirsén	Fase 2
	Reductasa de la HMGCoA	Estatinas	Fase 3
	CypA	Alisporivir	Fase 2/3
		SCY-635	Fase 2
		NIM811	Fase 2
Inhibidores del ensamblaje	$\alpha$ -Glucosidasa 1	Celgosivir	Fase 2
	DGAT-1	LCQ908	Fase 2
	CypA	NIM811	Fase 2
	PPAR $\alpha$	Naringenina	Fase 1
	HNF4 $\alpha$	Bezafibrato	Fase 4
Modificadores de la respuesta biológica	Respuestas inmunes	IFN- $\alpha$	Aprobado por las FDA y EMA
		IFN- $\lambda$	Fase 3
		Agonista de TLR7	Fase 1
		Agonista de TLR9	Fase 3
		Timosina $\alpha$ 1	Fase 3
		Nitazoxanida	Fase 2

**Tabla 1.** Resumen de los principales fármacos anti-VHC apuntando a dianas del hospedador, que han tenido eficacia al menos in vivo. Se muestra su clasificación por etapa del ciclo del VHC y la fase de desarrollo (Fuente: adaptado de Zeisel et al., 2015). “CD81”: Cluster designation 81; “SRB1”: Scavenger receptor class B member 1; “CLDN1”: Claudina-1; “NPC1L1”: Niemann–Pick C1-like 1; “Acm”: Anticuerpo monoclonal de ratón (murino); “miR122”: microARN-122; “HMGCoA”: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A; “DGAT-1”: Diacilglicerol O-aciltransferasa 1; “CypA”: Ciclosporina A; “PPAR $\alpha$ ”: peroxisome proliferator-activated receptor alpha; “HNF4 $\alpha$ ”: hepatocyte nuclear factor 4 alpha; “IFN- $\alpha$ ”: Interferón-alfa; “FDA”: Food and Drug Administration; “EMA”: European Medicines Agency; “IFN- $\lambda$ ”: Interferón-lambda.



### 1.9 (extra). Breve revisión anatomohistológica del hígado.

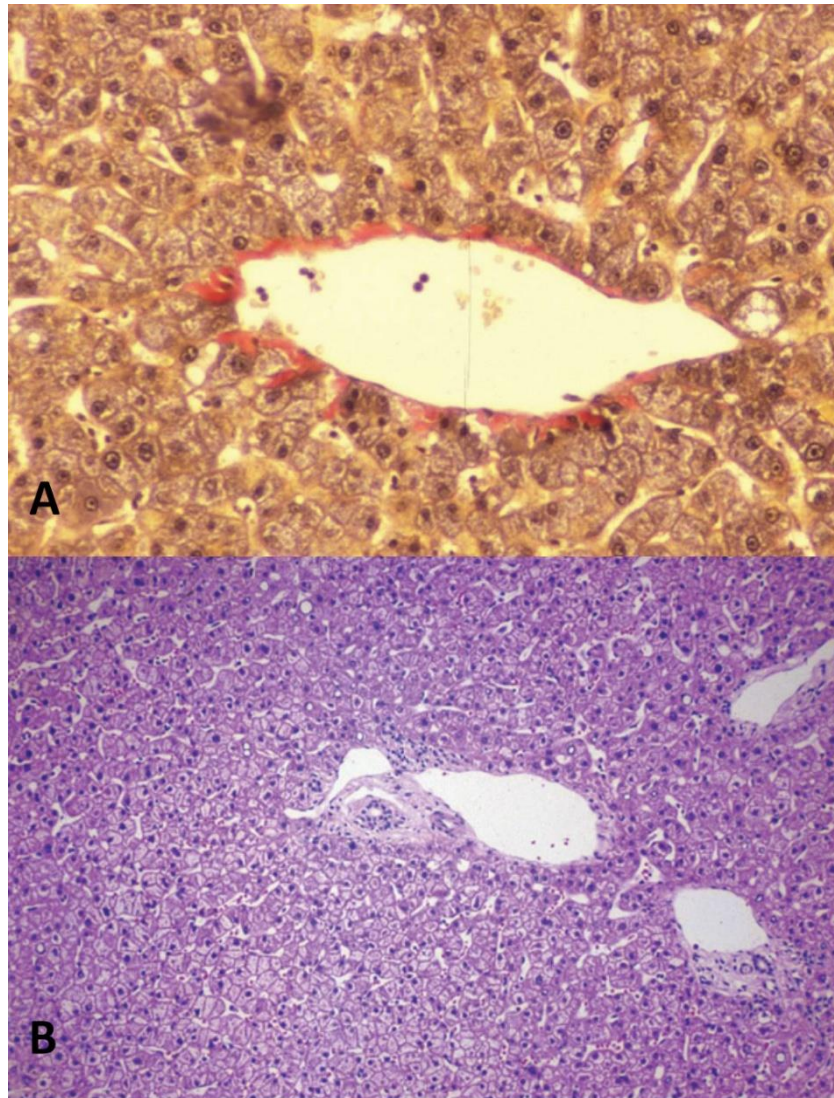
No se podría considerar la introducción como completa sin unas pinceladas anatómicas e histológicas del hígado, teniendo en cuenta que parte de los experimentos se ha efectuado sobre biopsias de hígado humano. Se dará a las descripciones un leve carácter funcional o fisiológico.

El hígado, que ocupa el espacio subfrénico derecho, es el órgano más voluminoso del organismo humano, con un peso de unos 2.300 g en el adulto vivo <sup>[198]</sup>. La sangre entra principalmente por la vena porta, cuyas sucesivas ramificaciones se acaban incorporando a estructuras muy distintivas denominadas tractos portales. Tras atravesar el hígado a través de los sinusoides hepáticos, donde tienen lugar las funciones hepáticas, la sangre se va recogiendo hacia las vénulas terminales (“venas centrolobulillares”) para llegar posteriormente a las venas suprahepáticas, y finalmente a la vena cava inferior. La contribución de la sangre proveniente de la arteria hepática es considerablemente menor, tanto por flujo como cualitativamente. Por último, una red de canalículos biliares, que tras ir aumentando de calibre, terminan en última instancia en el colédoco, sirven para drenar la bilis producida en los hepatocitos <sup>[199]</sup>.

Si nos centramos en los tractos portales, éstos están formados primariamente por las ramas portales junto con la envuelta de tejido conjuntivo que las protege. Pero en dichos tractos no sólo encontramos las ramas portales, sino que las ramas de las arterias hepáticas y conductos biliares viajan en el mismo “paquete”, formando la denominada tríada portal. A los tractos portales más pequeños, que son los que generalmente pueden verse en una biopsia, cortados de través, se les llama espacios porta. Todos los espacios porta están rodeados de parénquima hepático dispuesto en láminas de 1-2 hepatocitos de grosor, las cuales delimitan los sinusoides hepáticos. A este nivel se puede definir la unidad funcional del hígado, que es el lobulillo hepático según un modelo, y el acino de Rappaport según otro. Cada lobulillo hepático, que es más bien virtual que anatómico, está compuesto por una vena centrolobulillar y todos aquellos espacios porta y sinusoides que drenen en la misma. La estructura del acino de Rappaport se centraría en el espacio porta, y consideraría todo el parénquima que drena la sangre desde él hasta las venas centrolobulillares circundantes. Ambos puntos de vista son en realidad complementarios, aunque actualmente se considera al acino de

Rappaport como la unidad más útil. En cualquier caso, los elementos histológicos siguen siendo los mismos y siguen funcionando de igual manera.

Las diversas patologías hepáticas pueden dar multitud de lesiones o hallazgos distintivos en cualquiera de los elementos que componen los lobulillos o acinos hepáticos, en diversas combinaciones entre sí, y pueden ser más o menos específicas.



**Figura 16.** (A) Microfotografía mostrando una vena centrolobulillar (van Giesen, x200). (B) Microfotografía con varios espacios porta normales, cada uno con su rama de la vena porta y de la arteria hepática, y su conductillo biliar (hematoxilina-eosina, x200). (Fuente: modificado de Geller et al., 2009).



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 2. Hipótesis y objetivos

---

El VHC supone un problema médico muy relevante a nivel mundial, con una prevalencia de infección aproximada superior a los 180 millones de pacientes y una tasa de incidencia de muertes de unas 350.000 por persona por año. Con estas cifras, y teniendo en cuenta la progresión natural de la infección, no es de extrañar que se haya convertido en la primera causa de trasplante hepático en todos los continentes.

En los últimos años han visto la luz los primeros tratamientos antivirales con AAD, frecuentemente en terapias sin IFN, que están siendo muy efectivos. Sin embargo, cabe hacer dos matizaciones. Aun en la actual época de tratamiento con AAD, nuestro conocimiento pormenorizado del ciclo del VHC sigue siendo limitado. Sólo con conocimiento, a poder ser traslacional, se logrará mejorar más la situación actual y dar por acabada la carrera hacia la erradicación. No hay que olvidar que con las terapias sin IFN, basadas en fármacos con dianas víricas, existe el riesgo de resistencias. Por otro lado, los tratamientos actuales son caros y todavía poco extendidos, por lo que en muchos países se ha de tratar a los pacientes con regímenes basados en IFN, que tienen unos perfiles de seguridad y eficacia claramente mejorables, y en los que encontrar factores que permitan optimizar el tratamiento sigue siendo fundamental. Este último hecho es particularmente relevante en los pacientes con TH, en los que la infección progresa aceleradamente.

La infección por el VHC depende fisiopatológicamente de numerosos factores, tanto víricos como relacionados con el hospedador. Aunque generalmente se ha puesto el acento en los primeros, los factores del hospedador son fundamentales tanto para comprender los mecanismos del ciclo viral –la base para desarrollar nuevos fármacos– como para disponer de factores predictivos de respuesta al tratamiento.

Entre algunos de los factores del hospedador menos conocidos se encuentran los *P-bodies* y los GE. Su importancia es, en cambio, capital, pues publicaciones recientes indican que el VHC selecciona cuidadosamente algunos de sus componentes y manipula sus cinéticas naturales en beneficio propio. Estas alteraciones mostradas por las células infectadas no dejan de ser paradójicas, pues la maquinaria de la que los *P-bodies* y GE forman parte se encuentra dedicada al secuestro e incluso degradación del ARNm. Llama la atención pues que un virus de ARN que se traduce como si de un ARNm se tratase, utilice parte de esta peligrosa maquinaria con la precisión suficiente como para no ser degradado. No se han logrado nunca estudiar estas alteraciones *in vivo*, y aún

## 2. Hipótesis y objetivos

menos en humanos, por lo que su análisis podría ser clave para comprender las consecuencias a largo plazo de la infección, o incluso para desarrollar nuevos fármacos antivirales.

Por tanto, la **HIPÓTESIS 1** de trabajo es:

El VHC induce en el hígado del hospedador humano cambios intracelulares específicos en los *P-bodies* y GE.

Los **OBJETIVOS** para esta hipótesis son:

1. Caracterizar la distribución de *P-bodies* en hígados de pacientes infectados y no infectados por el VHC, comparándolas entre sí y con los resultados previos *in vitro*.
2. Sentar con ello las bases para investigación aplicada en el futuro.

Si volvemos la mirada a otros factores del hospedador no menos importantes, podremos comprobar el gran peso de la inmunidad innata. Los últimos años han visto un salto considerable hacia la medicina personalizada con el descubrimiento de los SNP de la IL-28B (rs8099917 y rs12979860). Éstos se han consolidado como los factores predictivos más importantes de aclaramiento espontáneo del virus y de respuesta al tratamiento con IFN, e incluso se les ha concedido algún papel en los tratamientos con AAD. El presente grupo de investigación fue uno de los pioneros en demostrar la complejidad de su influencia en el contexto del TH (según las combinaciones entre el genotipo del injerto y del receptor), población que sufre recidiva universal de la infección. En este grupo de pacientes, predecir la respuesta es particularmente importante, dado que los perfiles de eficacia y seguridad son especialmente desfavorables, y la progresión de la enfermedad, acelerada. Pero además, recientemente se ha descrito un nuevo SNP (ss469415590, nombrado definitivamente como rs368234815) en una región cercana, cuya potencia parece mayor que rs8099917 y rs12979860. También se le conoce como el polimorfismo del IFNL4. Su papel en el TH está por definirse.

## 2. Hipótesis y objetivos

---

Por lo tanto, la **HIPÓTESIS 2** de trabajo es:

El SNP rs368234815 (IFNL4) es un factor predictivo importante para la respuesta al tratamiento del VHC en los pacientes sometidos a TH.

Los **OBJETIVOS** para esta hipótesis son:

1. Estudiar la influencia del SNP rs368234815 en la respuesta al tratamiento antiviral en biterapia de pacientes TH con recidiva del VHC.
2. Correlacionar estos resultados con los genotipos de los anteriores SNP en los mismos pacientes, y comprobar qué SNP tiene un valor predictivo más potente en esta población.

### 3. RESUMEN DE LOS RESULTADOS





### 3. Resumen de los resultados

#### 3.1. TRABAJO 1: Estudio de los *P-bodies* en hígados de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C.

➤ Este trabajo se corresponde con el artículo "*Hepatitis C virus infection inhibits P-body granule formation in human livers*", disponible en el [Anexo I](#).

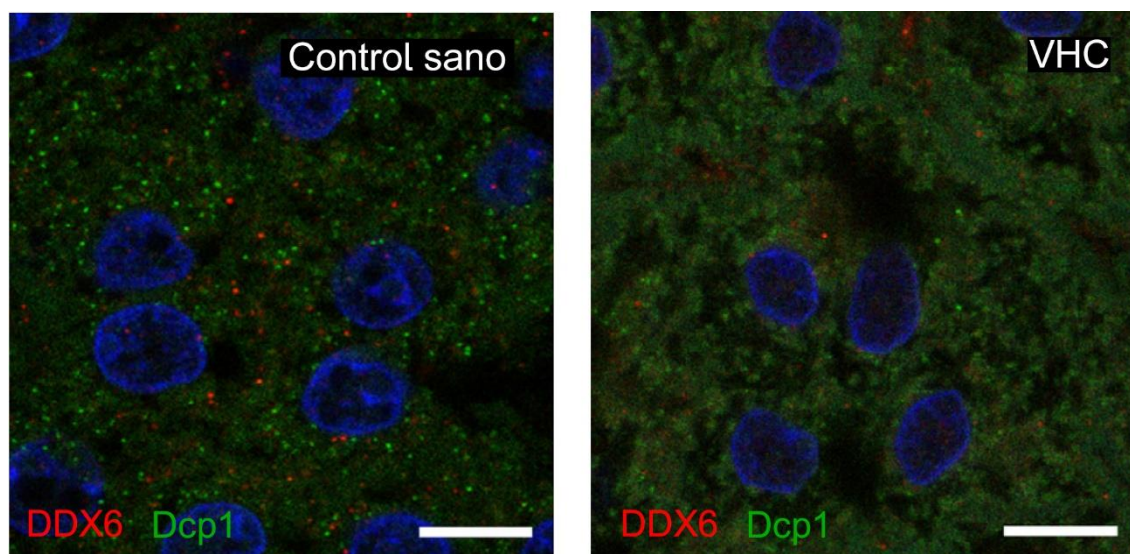
Para la elaboración de este primer trabajo, se seleccionó un total de 55 pacientes atendidos en el Hospital Clínic de Barcelona entre 2002 y 2013. Esta muestra se puede dividir en 4 cohortes principales: **19 pacientes inmunocompetentes** con infección crónica por VHC, y con biopsia hepática efectuada antes de iniciar tratamiento. La mayoría de estos pacientes presentaba características típicas de hepatitis crónica con un grado variable de necroinflamación periportal y/o lobular. Como grupo control negativo para VHC, se seleccionó a **10 donantes sanos** para TH de donante vivo, todos los cuales se habían sometido a biopsia hepática antes de la donación. Para comparar los hallazgos sobre hígado infectado por VHC con los hallazgos sobre hígado infectado por otra hepatitis vírica, se eligieron **8 pacientes con infección crónica por virus de la hepatitis B (VHB)**. La mayor parte de estos pacientes tenían características histológicas de hepatitis crónica. Para estudiar una posible influencia de la inflamación *per se* sobre los *P-bodies*, se seleccionaron **10 pacientes con TH, negativos para VHC y VHB, con cambios inflamatorios** en la biopsia hepática por causas no víricas, fundamentalmente por rechazo. La mayoría de éstos mostraba infiltrados inflamatorios linfoides portales asociados a un grado variable de inflamación lobulillar. Se estudiaron otros 3 grupos de pacientes: para evaluar la reversibilidad de los cambios en los *P-bodies*, también se seleccionó a 3 pacientes tratados y curados del VHC post-TH, de los cuales había disponibles biopsias de antes y después del tratamiento. Con el fin de valorar los cambios de los *P-bodies* en la infección aguda, seleccionamos a otros 3 pacientes con recidiva post-TH del VHC que se habían biopsiado en fase de hepatitis aguda (0,5 y 6 meses). Por último, se hicieron estudios de colocalización de las proteínas core y DDX6 en biopsias obtenidas de 2 pacientes con recidiva del VHC post-TH y carga viral muy alta (alrededor de 8 log<sub>10</sub> UI/mL), aprovechando la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación.

### 3. Resumen de los resultados

Todas estas biopsias, parafinadas, se procesaron, se hicieron tinciones de diversas proteínas por medio de inmunofluorescencia indirecta, y se analizaron mediante microscopía confocal, para obtener los siguientes resultados:

#### 3.1.1. Disminución específica de la abundancia de *P-bodies* en hígados de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C.

Se tiñeron las biopsias de los 19 pacientes infectados por el VHC y las 10 de donantes sanos para detectar los componentes DDX6 y Dcp1, propios de los *P-bodies*. Independientemente del genotipo y del grado de inflamación, el número de *P-bodies* con DDX6 y Dcp1 por hepatocito se redujo en 2 y 10 veces respectivamente, al comparar las tinciones de los pacientes infectados con los donantes sanos ( $p < 0,05$ ) (Figura 17). Al teñir las biopsias de los 8 pacientes con VHB y de los 10 pacientes con TH no infectados, no se observó una disminución significativa de DDX6 ni de Dcp1. De hecho, DDX6 aumentó ligeramente en los pacientes con VHB ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, las alteraciones observadas son específicas de la infección por VHC.



**Figura 17.** La infección por virus de la hepatitis C redujo el número de *P-bodies* comparado con donantes sanos. VHC: "Virus de la hepatitis C".

#### 3.1.2. El efecto del virus de la hepatitis C sobre los *P-bodies* ocurre tanto en fase aguda como crónica, y revierte con la respuesta viral sostenida.

Se analizó longitudinalmente el comportamiento de DDX6 y Dcp1 en los 3 pacientes TH con biopsia antes del tratamiento y tras la RVS. Efectivamente, antes del

### 3. Resumen de los resultados

---

tratamiento se observó una disminución en ambos componentes comparable a las descritas en el apartado previo. Tras la RVS, en cambio, estos marcadores se recuperaron en una magnitud igualmente comparable. Asimismo, al teñir las muestras de los 3 pacientes con recidiva post-TH en fase aguda, se vieron las mismas reducciones en el número de DDX6 y Dcp1 que en los 19 infectados crónicamente.

#### **3.1.3. Los *P-bodies* de las células somáticas son más heterogéneos *in vivo* de lo descrito *in vitro***

Inesperadamente, se observó que en los hepatocitos de nuestras biopsias, DDX6 y Dcp1 no colocalizaban, a diferencia de lo que se había publicado previamente *in vitro*, y que se daba por hecho. Por otro lado, estirpes celulares no hepatocitarias, como pueden ser los linfocitos, sí presentaban colocalización. Por tanto, los *P-bodies*, al menos en cuanto a estado de acumulación detectable, parecen más heterogéneos de lo que se pensaba, mostrando especificidad celular.

#### **3.1.4. El análisis en 3 dimensiones de hepatocitos individuales corrobora la disminución de *P-bodies* observada a un nivel histológico global.**

Dado que los análisis previos se efectuaron sobre un solo corte del microscopio confocal, y que esta técnica podría estar sesgada por distribuciones asimétricas de los *P-bodies* dentro de cada hepatocito, se llevaron a cabo análisis celulares individuales con reconstrucciones volumétricas. Se procedió a teñir las proteínas core y DDX6 en las muestras de los 2 pacientes con recidiva post-TH y alta carga viral. De este modo, podía restringirse la cuantificación de DDX6 específicamente a las células infectadas por el VHC. Y el resultado fue concordante con todo lo anterior: se observó una disminución de DDX6 a la mitad con respecto a los hepatocitos de los donantes sanos. Llama la atención que tanto haciendo análisis en 3 dimensiones como en monocorte, no se hallaron diferencias significativas entre los hepatocitos con core positivo y el resto de hepatocitos, dentro de la misma biopsia de cada paciente infectado. Otro hallazgo llamativo fue que DDX6 no colocalizaba con la proteína core del VHC, a diferencia de algún estudio previo *in vitro*.

#### 3.2. TRABAJO 2: Estudio de los polimorfismos del interferón-lambda 4 en pacientes trasplantados, tratados de recidiva post-trasplante del virus de la hepatitis C.

➤ Este trabajo se corresponde con el artículo "*IFNL4 polymorphism predicts response to hepatitis C treatment after liver transplantation*", disponible en el [Anexo II](#).

Para este segundo trabajo, se seleccionó una cohorte de 136 pacientes tratados entre 2000 y 2009 con terapia doble (IFN + RBV) por recidiva post-TH del VHC. De este grupo, se seleccionaron 86 pacientes mono infectados por VHC genotipo 1 con muestras tisulares tanto de donante como receptor. Estas muestras eran biopsias hepáticas parafinadas, obtenidas en el momento de la reperusión (donantes) o de los explantes (receptores). Se extrajo el ADN genómico, y sobre éste se determinaron los genomas de los SNP rs12979860 y rs8099917 mediante ensayos con sondas TaqMan®, y de rs368234815 por secuenciación directa.

De los 86 pacientes, 26 (30%) alcanzaron la RVS post-TH. El genotipo de rs368234815 se logró secuenciar en 86 receptores y 75 donantes. El de rs12979860 se obtuvo en todas las parejas donante-receptor, y el de rs8099917, en 83 receptores y 77 donantes. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la respuesta al tratamiento y ningún parámetro clínico, probablemente por el pequeño tamaño muestral.

##### 3.2.1. Distribución del genotipo de rs368234815 (IFNL4) en los receptores y sus donantes.

Las distribuciones de los 3 posibles genotipos fueron significativamente diferentes entre los receptores y sus respectivos donantes. Los receptores mostraron un enriquecimiento marcado de genotipos desfavorables TT/ $\Delta$ G y  $\Delta$ G/ $\Delta$ G: 57% y 21% en receptores *versus* 36% y 4% en donantes, respectivamente ( $p < 0,001$ ). En contraste, los donantes mostraron una frecuencia significativamente superior de genotipos favorables TT/TT (60% *versus* 22%). Dado que los SNP del IFNL3 rs12979860 y rs8099917 están en desequilibrio de ligamiento con rs12979860, su distribución fue claramente paralela a la de este último.

### 3. Resumen de los resultados

#### 3.2.2. Asociación del polimorfismo rs368234815 (IFNL4) con la respuesta al tratamiento según donantes y receptores.

El genotipo TT/TT de rs368234815 del receptor se asoció con la RVS ( $p = 0,024$ ) al compararlo con los 2 genotipos desfavorables (con alelos  $\Delta G$ ). Al hacer la misma comparación con el genotipo del donante, aunque los pacientes que recibieron un injerto TT/TT presentaron mayor RVS que los que recibieron un injerto con genotipo desfavorable (indistintamente del genotipo del receptor) no se alcanzó la significación estadística ( $p = 0,313$ ). Al evaluar las respuestas rápida y precoz (a las 4 y 12 semanas de tratamiento, respectivamente), se mantuvo la asociación con el genotipo favorable del receptor ( $p = 0,033$  y  $p < 0,001$  respectivamente). De nuevo, el genotipo del donante no se asoció a dichas respuestas rápida y precoz.

No obstante, dado que separar donante y receptor es artificioso porque ambos trasfondos genéticos conviven en el mismo paciente, que es el que se trasplanta, se consideraron las combinaciones de genotipos por parejas donante-receptor. Efectivamente, la combinación favorable-favorable del SNP de IFNL4 se asoció a RVS ( $p = 0,002$ ) por encima del resto de combinaciones. Se obtuvieron resultados muy similares con los SNP de IFNL3. Lo mismo ocurrió con las respuestas rápida y precoz.

#### 3.2.3. Utilidad del polimorfismo rs368234815 (IFNL4) para predecir la respuesta al tratamiento.

Sobre todo en los pacientes de origen africano, se había descrito una asociación más intensa con la RVS para rs368234815 que para rs12979860 y rs8099917. En nuestra población, fundamentalmente caucásica, no se encontró un beneficio sustancial en potencia predictiva al comparar rs368234815 y rs12979860 ([Tabla 2](#)).

SNP	RO	IC 95%	Valor de p
rs368234815 (IFNL4)	8,627	(2,056 - 23,198)	0,003
rs12979860 (IFNL3)	8,565	(2,023 - 35,245)	0,003
rs8099917 (IFNL3)	4,442	(1,561 - 12,638)	0,005

**Tabla 2.** Valor predictivo de respuesta viral sostenida para los 3 SNP, calculado mediante regresión logística binaria. SNP: Single nucleotide polymorphism. RO: Razón de odds. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

## 4. DISCUSIÓN



Como ya se ha expuesto de manera amplia y pormenorizada, recordamos que la infección por VHC constituye un problema mundial de primer orden, siendo la primera causa de trasplante hepático en todos los continentes en los que hay desarrollo médico suficiente. Se trata de un patógeno muy adaptado a la infección en humanos, probablemente durante miles de años en formas endémicas, que coincidiendo con la progresiva globalización del último siglo, se ha extendido hasta tomar dimensiones pandémicas. *A priori*, y dado el carácter crónico de la infección, parece que la inercia adquirida en estas décadas no va a frenarse fácilmente, por lo que aún se espera un aumento de sus complicaciones a largo plazo.

El ciclo del VHC, extraordinariamente complejo y aún con áreas de incertidumbre, está íntimamente ligado a los procesos y elementos del propio hospedador. Éstos son de capital importancia en todas las fases del ciclo vírico (entrada y desencapsidación, transcripción, replicación, ensamblaje y liberación). Por ello, aunque los modernos tratamientos con AAD se hayan centrado en las dianas víricas, hay un amplio margen de estudio para los factores relacionados con el hospedador. La importancia del conocimiento del ciclo del VHC en la mayor profundidad posible no es un asunto puramente académico. La Medicina actual ha logrado unas cotas de desarrollo sin parangón gracias a su apoyo en la Ciencia básica, constituyendo lo que se ha venido a denominar Medicina Traslacional. De este modo, se logra dar respuesta mediante metodología de laboratorio a problemas que surgen a pie de cama. Precisamente, un ejemplo brillante son los tratamientos antivirales actuales, con porcentajes de RVS superiores al 90-95% en la mayor parte de poblaciones de pacientes. Por lo tanto, el conocimiento es la única arma efectiva contra la enfermedad, y aun en la actual época de optimismo contra la infección por VHC, la erradicación no parece muy cercana. Conocer mejor los elementos del hospedador implicados en el ciclo nos sigue permitiendo buscar factores predictivos, y también desarrollar nuevos tratamientos que no estén lastrados por el riesgo de sustituciones asociadas a resistencia en el genoma del VHC.

En esta tesis, utilizando la Medicina Traslacional, se han estudiado 2 elementos clave del hospedador: los *P-bodies* y los SNP asociados a IFNL4 e IFNL3.

Respecto de los *P-bodies*, se puede decir que los estudios *in vivo* son esenciales para comprender en profundidad la compleja interacción patogénica entre VHC y hepatocito. Así, en nuestro trabajo reportamos que la infección por VHC deteriora la formación de *P-bodies* en hepatocitos de hígado humano independientemente del genotipo, grado de inflamación, estadio de fibrosis, o si en definitiva, la infección es aguda o crónica. Estas alteraciones observadas fueron específicas del VHC, pues no se observaron reducciones significativas en pacientes infectados por el VHB o con cambios inflamatorios no relacionados con infección vírica. Además, el número de *P-bodies* se recuperó una vez alcanzada la RVS con tratamiento antiviral, lo cual refuerza la especificidad del VHC. Resulta interesante que el número de *P-bodies* por hepatocito fuese muy heterogéneo entre individuos, comprendiendo un amplio rango de valores en donantes sanos, pacientes infectados por VHB y pacientes con inflamación no causada por virus. De cualquier modo, ese rango se estrechó muy considerablemente en los pacientes infectados por VHC, indicando que su infección era un factor decisivo en los fenómenos observados.

Una observación inesperada fue la heterogeneidad *in vivo* de los *P-bodies*. Hasta donde sabemos, todos los estudios previos sobre *P-bodies* en células somáticas se habían llevado a cabo sobre líneas celulares *in vitro*. En ellas, DDX6 y Dcp1, que son dos componentes ampliamente usados para visualizar los *P-bodies*, siempre colocalizaban <sup>[149]</sup>. En cambio, no apreciamos colocalización alguna de estos dos componentes dentro de los hepatocitos de nuestras muestras, en ninguno de los grupos estudiados. Una composición variable de los *P-bodies* entre distintos tipos celulares podría reflejar sus respectivas diferencias y particulares necesidades de regulación <sup>[200]</sup>. Actualmente, no se sabe si se trata de una característica exclusiva de los hepatocitos (los linfocitos, por ejemplo, sí mostraban colocalización entre DDX6 y Dcp1), o si se podría ver también en otras estirpes celulares. Otra observación en conflicto con la literatura previa publicada a partir de experimentos sobre cultivo celular, fue la no colocalización entre DDX6 y la proteína vírica core. Un estudio previo determinó que se producía un secuestro de DDX6 (entre otros componentes de los *P-bodies*), hacia las GL, lugar en el que esta proteína colocalizaba con core del VHC de la estirpe JFH1 <sup>[148]</sup>. Sin embargo, en otro estudio con la estirpe Jc1 no se apreció este hallazgo <sup>[149]</sup>. Estos resultados en conflicto podrían



reflejar diferencias en las dinámicas entre DDX6 y core de las dos estirpes víricas. Por último, otra observación interesante es que los *P-bodies* con DDX6 y con Dcp1 tuvieron comportamientos diferentes entre sí según las condiciones. En los hepatocitos de pacientes infectados por el VHB, el número de *P-bodies* con DDX6 se incrementó en relación con los de los donantes sanos. Esto contrasta con que los hepatocitos de los pacientes infectados por el VHB mostraron una tendencia a la baja de los *P-bodies* con Dcp1, de nuevo al compararlos con controles sanos. Aunque desconocemos las causas de estos comportamientos diferenciales, éstos podrían reflejar una especialización en los *P-bodies*. Tomando en su conjunto todas las observaciones acerca de la portentosa variabilidad de los *P-bodies* según el tipo celular, e incluso entre distintas células del mismo tipo, vemos que la complejidad de estos orgánulos sube a un nuevo nivel, hecho que merece nuevos estudios.

La reducción en el número de los *P-bodies* podría tener efectos importantes para la biología de la célula. Los componentes de los *P-bodies* están en un equilibrio dinámico entre la solubilidad dispersa y los gránulos diferenciados, y por tanto, una reducción en el número de gránulos se traduce en un aumento de componentes dispersos por el citosol <sup>[127, 201]</sup>. Dado que los componentes de los *P-bodies* incluyen múltiples proteínas que controlan la degradación y silenciamiento del ARNm, el transcriptoma y traductoma podrían desregularse, y en consecuencia, verse alterada la expresión génica. En la infección crónica, la reducción de *P-bodies* ocasionada por el VHC podría resultar en una alteración de la expresión génica a largo plazo que podría contribuir a la patogenia de las complicaciones tardías. En línea con esta argumentación, la sobreexpresión de DDX6 se ha asociado al cáncer en diversos estudios <sup>[130]</sup>.

Aún no se comprende del todo el cómo y el porqué de esa disrupción de los *P-bodies* provocada por el VHC. Hay datos previos sobre líneas celulares de hepatoma que apoyan la hipótesis de que el VHC produciría estos efectos a base de secuestrar componentes de los *P-bodies*, o bien de modificar componentes clave para la formación de los mismos. Lsm1-7, Pat1 y DDX6 son 3 componentes fundamentales de los *P-bodies* con un papel muy importante en la degradación del ARNm. El VHC necesita estos factores y los redirige para cumplir un papel en su ciclo, probablemente en la traducción y replicación <sup>[148, 149]</sup>. Al mismo tiempo, el VHC podría beneficiarse de la disrupción subsecuente en

los *P-bodies*, dado que éstos se han relacionado también con la inmunidad innata [116]. Resulta intrigante que la reducción de los *P-bodies* inducida por el VHC *in vivo* fuese similar en las células positivas para core que en las negativas. Es posible que niveles de replicación muy bajos con replicación indetectable sean suficientes para causar una disrupción en los *P-bodies*, o incluso que las células infectadas por el VHC pudieran inducir dicha disrupción en sus compañeras circundantes a través de mecanismos desconocidos por ahora. Esta última hipótesis podría verse apoyada por algún estudio reciente sobre la perturbación de la zonación hepática en hígados infectados por VHC [202].

Desde luego, estos estudios son el primer análisis pormenorizado *in vivo* que se hace sobre *P-bodies*, y una demostración directa de que puede existir relación patogénica entre ciertas enfermedades y estos gránulos.

Cerrando el bloque de los *P-bodies*, pasamos a discutir sobre los SNP asociados a IFNL4 e IFNL3. A este respecto, se puede decir que el TH es un entorno privilegiado para estudiar las interacciones entre VHC y hospedador, debido a una serie de características especiales, como el hecho de tener bien definido el momento de la infección, o que el órgano infectado y el paciente puedan diferenciarse por proceder de individuos distintos. Pero además, los pacientes trasplantados con recidiva por VHC constituyen una población especial en la que los tratamientos basados en IFN son particularmente mal tolerados y poco efectivos. Algunos estudios han investigado el papel de los SNP asociados a IFNL3, pero ninguno ha centrado su atención en el novedoso rs368234815 antes que el presente trabajo [75, 186-188]. Con nuestros resultados demostramos que, al igual que los SNP asociados a IFNL3, rs368234815 tiene una fuerte influencia sobre la respuesta al tratamiento antiviral post-TH con PEG-IFN y RBV. Dado que los 3 polimorfismos se encuentran en marcado desequilibrio de ligamiento, IFNL4 se correlacionó muy bien con los del IFNL3. Como cabría esperar de una población eminentemente caucásica, la coincidencia entre los genotipos de rs368234815 y rs12979860 fue casi completa, siendo levemente inferior al compararse con rs8099917. De manera similar a los SNP asociados a IFNL3, los receptores mostraron una frecuencia mayor de genotipos desfavorables de IFNL4 al compararlos con los donantes [75, 186-189].

Presumiblemente, esto sería consecuencia de una selección en base a su respuesta inmune menos eficiente contra el VHC, tanto en fase aguda como con el tratamiento.

En un primer análisis, el genotipo del receptor parecía tener un papel determinante en lograr la RVS post-TH, mientras que el del donante parecía tener un peso más modesto. De hecho, el genotipo del receptor se asoció significativamente con la cinética viral durante el tratamiento. Por otro lado, la combinación de genotipos favorables simultáneamente en donante y receptor, se asoció a dicha cinética y a la RVS: aquellos receptores con genotipos favorables de IFNL4 que también recibieron un injerto de un donante con genotipo favorable, alcanzaron las respuestas rápida, precoz y sostenida más frecuentemente que los que recibieron injertos con genotipos desfavorables. Todos estos hallazgos están en absoluta congruencia con lo previamente publicado sobre rs12979860 y rs8099917 [75, 186, 187]. Por otro lado, también apoyan que el acervo genético del donante tenga un efecto positivo en la sensibilidad al tratamiento, evidenciando la bella complejidad de la coexistencia de dos trasfondos genéticos.

Se ha descrito que el SNP de IFNL4 tiene un valor predictivo mayor que los SNP asociados a IFNL3, particularmente en pacientes de origen africano [37, 170, 171, 179, 203]. Sin embargo, algún trabajo posterior en pacientes caucásicos no encontró un beneficio sustancial en usar rs368234815 en vez de rs12979860 [180]. Otro estudio con pacientes japoneses, llegó a resultados muy parecidos con rs8099917 [172]. En esta tesis se calculó la razón de *odds* de los tres SNP, y aunque ésta fue ligeramente superior para IFNL4, la diferencia es tan pequeña que nos parece clínicamente irrelevante (Tabla 2), especialmente cuando el genotipado de los SNP asociados a IFNL3 está ya establecido en la práctica clínica. De cualquier modo, la utilidad de estos 3 SNP no debería subestimarse en el actual momento de optimismo en el que los regímenes sin IFN ofrecen tan buenos resultados. Por un lado, se ha descrito una influencia de rs368234815 en la respuesta al tratamiento de pacientes tratados con Sofosbuvir sin IFN [204]. Por el otro, hay que tener en cuenta que los modernos regímenes libres de IFN se están pudiendo costear en una minoría de países, y en la mayor parte de esos casos, no sin un sinfín de problemas económicos y administrativos. Por lo tanto, se siguen empleando tratamientos basados en IFN en una proporción significativa de naciones, en los que estos SNP tienen un papel importante.

En cualquier caso, nuestros hallazgos sobre la contribución de donantes y receptores a la respuesta al tratamiento, concordante para los SNP asociados a IFNL3 e IFNL4, traen a colación consideraciones más amplias sobre la interacción VHC-hospedador. Los pacientes trasplantados muestran una mezcla de acervos genéticos en la que casi todas las células parenquimatosas hepáticas vienen del donante, pero el injerto se ve rápidamente poblado por células procedentes del receptor, tanto linfocitos como otras estirpes <sup>[65-68]</sup>. Para una mejor comprensión de las implicaciones que esta singularidad comporta, se puede tomar un punto de vista más bien molecular: la primera publicación sobre la influencia del SNP rs368234815 en la respuesta al VHC sugería una vía completamente nueva en la inmunidad innata a través de la novedosa proteína IFN-λ4 <sup>[37]</sup>. Los estudios posteriores aportaron más información acerca del pseudogen y la proteína, mostrando que aunque IFN-λ4 presente actividad *in vitro* sobre células derivadas de hepatocitos y de epitelio bronquial, parece tener desventajas frente a otros como IFN-λ3 <sup>[169]</sup>. En las PBMC, en cambio, el genotipo de IFNL4 se correlacionó con los niveles de expresión de IFN-λ3 e IP-10 <sup>[170]</sup>. Por último, hay estudios previos sobre los SNP asociados a IFNL3 y los niveles de ISG, con correlaciones distintas según la línea celular (hepatocitos, células de Kupffer o PBMC). Integrando todos estos trabajos, es posible sustentar la hipótesis de que la influencia de rs368234815 podría tener mecanismos diferentes según el tipo celular. Por tanto, atendiendo a la interacción tan compleja entre células parenquimatosas hepáticas y del sistema inmune para donante y receptor, se podría justificar esa contribución diferencial de ambos individuos a la respuesta post-tratamiento.

## 5. CONCLUSIONES



1. La infección por VHC deteriora la formación de *P-bodies* en hepatocitos de hígado humano. Esta alteración es específica del VHC, reversible tras la RVS, e independiente del genotipo, grado de inflamación, estadio de fibrosis, o si la infección es aguda o crónica.
2. A diferencia de lo observado *in vitro*, los *P-bodies* muestran una distribución heterogénea, con una importante variabilidad tanto entre células de la misma estirpe como de estirpes diferentes. Estas variaciones podrían reflejar las diversas necesidades y especializaciones de cada célula o tipo celular.
3. La reducción en el número de los *P-bodies* podría tener efectos importantes para la biología de la célula, contribuyendo a la patogenia de las complicaciones que la infección por el VHC produce a largo plazo.
4. La respuesta al tratamiento antiviral en la recidiva post-TH de la infección por VHC es significativamente mejor en receptores de TH con genotipo favorable de rs368234815 en comparación con los que poseen un genotipo desfavorable. El genotipo del donante también tiene un papel en dicha respuesta.
5. En nuestra población de estudio, el valor predictivo de rs368234815 para predecir la respuesta al tratamiento no aporta ventajas clínicamente significativas con respecto al amplio uso de rs12979860, pese a su gran potencia.
6. El SNP rs368234815 y el resto de polimorfismos de IFNL4 todavía son importantes en la actual era de AAD y tratamientos sin IFN, pues nos sigue permitiendo comprender en mayor profundidad las interacciones entre VHC y hospedador. En este sentido, receptor y donante de hígado ofrecen perspectivas complementarias.
7. En la infección por el VHC, con una compleja interacción entre virus y hospedador, los factores dependientes del hospedador son de capital importancia, mostrándose útiles para comprender mejor el proceso y mejorar el manejo clínico de los pacientes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA



- [1] Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009; 29 Suppl 1:74-81.
- [2] WHO: World Health Organization. Hepatitis C. Fact sheet N°164. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html>. Fecha de acceso: 4 de Junio de 2014.
- [3] Crespo G, Marino Z, Navasa M, Forns X. Viral hepatitis in liver transplantation. *Gastroenterology* 2012; 142:1373-1383 e1371.
- [4] Razavi H, Elkhoury AC, Elbasha E, Estes C, Pasini K, Poynard T *et al.* Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United States. *Hepatology* 2013; 57:2164-2170.
- [5] Razavi H, Waked I, Sarrazin C, Myers RP, Idilman R, Calinas F *et al.* The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat* 2014; 21 Suppl 1:34-59.
- [6] Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 385:117-171.
- [7] van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, Wedemeyer H, Dufour JF, Lammert F *et al.* Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA* 2012; 308:2584-2593.
- [8] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-362.
- [9] Bruggmann P, Berg T, Ovrehus AL, Moreno C, Brandao Mello CE, Roudot-Thoraval F *et al.* Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *J Viral Hepat* 2014; 21 Suppl 1:5-33.
- [10] Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C *et al.* A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int* 2011; 31 Suppl 2:30-60.
- [11] Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 2014; 61:S58-68.



- [12] Lambers FA, Prins M, Thomas X, Molenkamp R, Kwa D, Brinkman K *et al.* Alarming incidence of hepatitis C virus re-infection after treatment of sexually acquired acute hepatitis C virus infection in HIV-infected MSM. *AIDS* 2011; 25:F21-27.
- [13] Boyer TD, Manns MP, Sanyal AJ. *Zakim and Boyer's Hepatology*. 6 ed: Elsevier Saunders, 2012.
- [14] Gonzalez-Garcia JJ, Mahillo B, Hernandez S, Pacheco R, Diz S, Garcia P *et al.* Prevalences of hepatitis virus coinfection and indications for chronic hepatitis C virus treatment and liver transplantation in Spanish HIV-infected patients. The GESIDA 29/02 and FIPSE 12185/01 Multicenter Study. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23:340-348.
- [15] Antiretroviral Therapy Cohort C. Causes of death in HIV-1-infected patients treated with antiretroviral therapy, 1996-2006: collaborative analysis of 13 HIV cohort studies. *Clin Infect Dis* 2010; 50:1387-1396.
- [16] Graham CS, Baden LR, Yu E, Mrus JM, Carnie J, Heeren T *et al.* Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2001; 33:562-569.
- [17] Calleja JL, Crespo J, Hígado AE *Ed.* Libro Blanco de la Hepatología en España. 1 ed. Madrid: Asociación Española para el Estudio del Hígado, 2015.
- [18] Sola R, Cruz De Castro E, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jordi R *et al.* Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study. *Med Clin (Barc)* 2002; 119:90-95.
- [19] Suarez A, Viejo G, Navascues CA, Garcia R, Diaz G, Saro C *et al.* The prevalence of hepatitis A, B and C viral markers in the population of Gijon between 26 and 65 years old. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20:347-352.
- [20] Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008; 48:148-162.
- [21] Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A *et al.* Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003; 125:80-88.
- [22] Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292:767-770.
- [23] Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that

the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985; 88:773-779.

[24] Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol* 2011; 92:233-246.

[25] Chevaliez S, Pawlotsky JM: HCV Genome and Life Cycle. In: Tan SL, ed. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK), 2006.

[26] Koutsoudakis G, Forns X, Perez-Del-Pulgar S. The molecular biology of hepatitis C virus. *Gastroenterol Hepatol* 2013; 36:280-293.

[27] Korba B, Shetty K, Medvedev A, Viswanathan P, Varghese R, Zhou B *et al.* Hepatitis C virus Genotype 1a core gene nucleotide patterns associated with hepatocellular carcinoma risk. *J Gen Virol* 2015; 96:2928-2937.

[28] Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 2006; 55:123-130.

[29] Kanwal F, Kramer JR, Ilyas J, Duan Z, El-Serag HB. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology* 2014; 60:98-105.

[30] Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* 2013; 19:837-849.

[31] Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11:688-700.

[32] Chatel-Chaix L, Bartenschlager R. Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: the enemy inside--caught in the web. *J Virol* 2014; 88:5907-5911.

[33] Rupp D, Bartenschlager R. Targets for antiviral therapy of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2014; 34:9-21.

[34] Colpitts CC, Lupberger J, Doerig C, Baumert TF. Host cell kinases and the hepatitis C virus life cycle. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1854:1657-1662.

[35] Madan V, Bartenschlager R. Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroprotein. *Viruses* 2015; 7:4461-4481.

[36] Shehat MG, Bahey-El-Din M, Kassem MA, Farghaly FA, Abdul-Rahman MH, Fanaki NH. Recombinant expression of the alternate reading frame protein (ARFP) of hepatitis

C virus genotype 4a (HCV-4a) and detection of ARFP and anti-ARFP antibodies in HCV-infected patients. *Arch Virol* 2015; 160:1939-1952.

[37] Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H *et al.* A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* 2013; 45:164-171.

[38] Langergraber KE, Prufer K, Rowney C, Boesch C, Crockford C, Fawcett K *et al.* Generation times in wild chimpanzees and gorillas suggest earlier divergence times in great ape and human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:15716-15721.

[39] Rogers J, Gibbs RA. Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics. *Nat Rev Genet* 2014; 15:347-359.

[40] Key FM, Peter B, Dennis MY, Huerta-Sanchez E, Tang W, Prokunina-Olsson L *et al.* Selection on a variant associated with improved viral clearance drives local, adaptive pseudogenization of interferon lambda 4 (IFNL4). *PLoS Genet* 2014; 10:e1004681.

[41] Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML *et al.* Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 2006; 313:523-526.

[42] Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, Medina JL, Henriquez JA, Mishra N *et al.* Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *J Virol* 2012; 86:6171-6178.

[43] Matsuu A, Hobo S, Ando K, Sanekata T, Sato F, Endo Y *et al.* Genetic and serological surveillance for non-primate hepacivirus in horses in Japan. *Vet Microbiol* 2015; 179:219-227.

[44] Corman VM, Grundhoff A, Baechlein C, Fischer N, Gmyl A, Wollny R *et al.* Highly divergent hepaciviruses from African cattle. *J Virol* 2015; 89:5876-5882.

[45] Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA *et al.* Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:11608-11613.

[46] El-Attar LM, Mitchell JA, Brooks Brownlie H, Priestnall SL, Brownlie J. Detection of non-primate hepaciviruses in UK dogs. *Virology* 2015; 484:93-102.

[47] Drexler JF, Corman VM, Muller MA, Lukashev AN, Gmyl A, Coutard B *et al.* Evidence for novel hepaciviruses in rodents. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003438.

- [48] Quan PL, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, Anthony SJ *et al.* Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:8194-8199.
- [49] Simmonds P. The origin of hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 369:1-15.
- [50] Parrish CR, Murcia PR, Holmes EC. Influenza virus reservoirs and intermediate hosts: dogs, horses, and new possibilities for influenza virus exposure of humans. *J Virol* 2015; 89:2990-2994.
- [51] Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P *et al.* Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 2005; 438:575-576.
- [52] Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014; 59:318-327.
- [53] Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2015; 61:77-87.
- [54] Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG *et al.* The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med* 2009; 6:e1000198.
- [55] Pybus OG, Cochrane A, Holmes EC, Simmonds P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol* 2005; 5:131-139.
- [56] El-Zanaty F, Way A. Egypt Demographic and Health Survey 2008. En: Egypt: Ministry of Health E-ZaA, and Macro International, editor. Cairo 2009.
- [57] Pybus OG, Drummond AJ, Nakano T, Robertson BH, Rambaut A. The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol* 2003; 20:381-387.
- [58] Murphy DG, Willems B, Deschenes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1102-1112.
- [59] Echevarria JM, Leon P, Pozo F, Avellon A. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996-2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:20-25.

- [60] Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J *et al.* Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* 2001; 64:334-339.
- [61] Cox AL, Netski DM, Mosbruger T, Sherman SG, Strathdee S, Ompad D *et al.* Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005; 40:951-958.
- [62] Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461:399-401.
- [63] Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Charlet JP, Selves J *et al.* Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1997; 113:1675-1681.
- [64] Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M *et al.* Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35:680-687.
- [65] Gouw AS, Houthoff HJ, Huitema S, Beelen JM, Gips CH, Poppema S. Expression of major histocompatibility complex antigens and replacement of donor cells by recipient ones in human liver grafts. *Transplantation* 1987; 43:291-296.
- [66] Hove WR, van Hoek B, Bajema IM, Ringers J, van Krieken JH, Lagaaij EL. Extensive chimerism in liver transplants: vascular endothelium, bile duct epithelium, and hepatocytes. *Liver Transpl* 2003; 9:552-556.
- [67] Kleeberger W, Rothamel T, Glockner S, Flemming P, Lehmann U, Kreipe H. High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis. *Hepatology* 2002; 35:110-116.
- [68] Shi X, Moroso V, Metselaar HJ, Kwekkeboom J. Long-lived intra-graft donor leukocytes or relocated donor hematopoietic stem/progenitor cells can cause long-term hematopoietic chimerism after liver transplantation. *Hepatology* 2013; 57:2542.
- [69] Schluger LK, Sheiner PA, Thung SN, Lau JY, Min A, Wolf DC *et al.* Severe recurrent cholestatic hepatitis C following orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1996; 23:971-976.

- [70] Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N *et al.* Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 2003; 9:1231-1243.
- [71] Blasco A, Forns X, Carrion JA, Garcia-Pagan JC, Gilabert R, Rimola A *et al.* Hepatic venous pressure gradient identifies patients at risk of severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2006; 43:492-499.
- [72] Carrion JA, Torres F, Crespo G, Miquel R, Garcia-Valdecasas JC, Navasa M *et al.* Liver stiffness identifies two different patterns of fibrosis progression in patients with hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2010; 51:23-34.
- [73] Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122:889-896.
- [74] Ramirez S, Perez-Del-Pulgar S, Carrion JA, Costa J, Gonzalez P, Massaguer A *et al.* Hepatitis C virus compartmentalization and infection recurrence after liver transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9:1591-1601.
- [75] Coto-Llerena M, Perez-Del-Pulgar S, Crespo G, Carrion JA, Martinez SM, Sanchez-Tapias JM *et al.* Donor and recipient IL28B polymorphisms in HCV-infected patients undergoing antiviral therapy before and after liver transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11:1051-1057.
- [76] Carrion JA, Navasa M, Garcia-Retortillo M, Garcia-Pagan JC, Crespo G, Bruguera M *et al.* Efficacy of antiviral therapy on hepatitis C recurrence after liver transplantation: a randomized controlled study. *Gastroenterology* 2007; 132:1746-1756.
- [77] Berenguer M, Palau A, Aguilera V, Rayon JM, Juan FS, Prieto M. Clinical benefits of antiviral therapy in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8:679-687.
- [78] Berenguer M. Systematic review of the treatment of established recurrent hepatitis C with pegylated interferon in combination with ribavirin. *J Hepatol* 2008; 49:274-287.
- [79] Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285:110-113.
- [80] Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003; 197:633-642.

- [81] Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM *et al.* Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:7271-7276.
- [82] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11:791-796.
- [83] Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR *et al.* Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:9294-9299.
- [84] Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC *et al.* Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309:623-626.
- [85] Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:7408-7413.
- [86] Vercauteren K, de Jong YP, Meuleman P. Animal models for the study of HCV. *Curr Opin Virol* 2015; 13:67-74.
- [87] Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Trepo C *et al.* In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 1998; 91:3841-3849.
- [88] Pal S, Sullivan DG, Kim S, Lai KK, Kae J, Cotler SJ *et al.* Productive replication of hepatitis C virus in perihepatic lymph nodes in vivo: implications of HCV lymphotropism. *Gastroenterology* 2006; 130:1107-1116.
- [89] Sansonno D, Iacobelli AR, Cornacchiulo V, Iodice G, Dammacco F. Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 1996; 103:414-421.
- [90] Maggi F, Giorgi M, Fornai C, Morrica A, Vatteroni ML, Pistello M *et al.* Detection and quasispecies analysis of hepatitis C virus in the cerebrospinal fluid of infected patients. *J Neurovirol* 1999; 5:319-323.
- [91] Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G *et al.* Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003; 187:1951-1958.



- [92] Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282:938-941.
- [93] Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S *et al.* Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 2012; 18:281-285.
- [94] Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009; 457:882-886.
- [95] Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L *et al.* EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011; 17:589-595.
- [96] Zona L, Lupberger J, Sidahmed-Adrar N, Thumann C, Harris HJ, Barnes A *et al.* HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* 2013; 13:302-313.
- [97] Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Weiner A, Zhu Q, Pizza M *et al.* CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* 2008; 82:8316-8329.
- [98] Martin DN, Uprichard SL. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:10777-10782.
- [99] Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ *et al.* Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 2008; 47:17-24.
- [100] Graw F, Balagopal A, Kandathil AJ, Ray SC, Thomas DL, Ribeiro RM *et al.* Inferring viral dynamics in chronically HCV infected patients from the spatial distribution of infected hepatocytes. *PLoS Comput Biol* 2014; 10:e1003934.
- [101] Garaigorta U, Chisari FV. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* 2009; 6:513-522.
- [102] Horner SM, Gale M, Jr. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat Med* 2013; 19:879-888.
- [103] Wack A, Terczynska-Dyla E, Hartmann R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat Immunol* 2015; 16:802-809.



- [104] Rosnoblet C, Fritzing B, Legrand D, Launay H, Wieruszeski JM, Lippens G *et al.* Hepatitis C virus NS5B and host cyclophilin A share a common binding site on NS5A. *J Biol Chem* 2012; 287:44249-44260.
- [105] Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ *et al.* Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282:103-107.
- [106] Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66:3225-3229.
- [107] Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M *et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007; 9:1089-1097.
- [108] Mensa L, Perez-del-Pulgar S, Crespo G, Koutsoudakis G, Fernandez-Carrillo C, Coto-Llerena M *et al.* Imaging of hepatitis C virus infection in liver grafts after liver transplantation. *J Hepatol* 2013; 59:271-278.
- [109] Anderson P, Kedersha N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10:430-436.
- [110] Decker CJ, Parker R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4:a012286.
- [111] Barbee SA, Estes PS, Cziko AM, Hillebrand J, Luedeman RA, Collier JM *et al.* Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* 2006; 52:997-1009.
- [112] Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W *et al.* The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:2647-2652.
- [113] Beckham CJ, Parker R. P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe* 2008; 3:206-212.
- [114] Buchan JR, Kolaitis RM, Taylor JP, Parker R. Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. *Cell* 2013; 153:1461-1474.
- [115] Ramaswami M, Taylor JP, Parker R. Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell* 2013; 154:727-736.

- [116] Lloyd RE. Regulation of stress granules and P-bodies during RNA virus infection. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013; 4:317-331.
- [117] Blanco FF, Sanduja S, Deane NG, Blackshear PJ, Dixon DA. Transforming growth factor beta regulates P-body formation through induction of the mRNA decay factor tristetraprolin. *Mol Cell Biol* 2014; 34:180-195.
- [118] Mitchell SF, Parker R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol Cell* 2014; 54:547-558.
- [119] Poblete-Duran N, Prades-Perez Y, Vera-Otarola J, Soto-Rifo R, Valiente-Echeverria F. Who Regulates Whom? An Overview of RNA Granules and Viral Infections. *Viruses* 2016; 8.
- [120] Bashkirov VI, Scherthan H, Solinger JA, Buerstedde JM, Heyer WD. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol* 1997; 136:761-773.
- [121] Eystathiou T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzler MJ. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* 2002; 13:1338-1351.
- [122] Sheth U, Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 2003; 300:805-808.
- [123] Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:121-127.
- [124] Kroschwald S, Maharana S, Mateju D, Malinowska L, Nuske E, Poser I *et al.* Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules. *Elife* 2015; 4:e06807.
- [125] Lin Y, Protter DS, Rosen MK, Parker R. Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Mol Cell* 2015; 60:208-219.
- [126] Stoecklin G, Mayo T, Anderson P. ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. *EMBO Rep* 2006; 7:72-77.
- [127] Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:9-22.
- [128] Decker CJ, Teixeira D, Parker R. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2007; 179:437-449.

- [129] Buchan JR, Muhlrad D, Parker R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2008; 183:441-455.
- [130] Iio A, Takagi T, Miki K, Naoe T, Nakayama A, Akao Y. DDX6 post-transcriptionally down-regulates miR-143/145 expression through host gene NCR143/145 in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1829:1102-1110.
- [131] Amrani N, Sachs MS, Jacobson A. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:415-425.
- [132] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281-297.
- [133] Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 2005; 122:17-20.
- [134] Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 1999; 147:1431-1442.
- [135] Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, Stahl J *et al*. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* 2002; 13:195-210.
- [136] McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A *et al*. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J Biol Chem* 2005; 280:16925-16933.
- [137] Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci* 2005; 118:981-992.
- [138] Rzeczkowski K, Beuerlein K, Muller H, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Kettner-Buhrow D *et al*. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies. *J Cell Biol* 2011; 194:581-596.
- [139] Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 1998; 12:2293-2304.
- [140] Scheller N, Mina LB, Galao RP, Chari A, Gimenez-Barcons M, Noueiry A *et al*. Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:13517-13522.

- [141] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005; 309:1577-1581.
- [142] Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C *et al.* microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 2008; 27:3300-3310.
- [143] Jangra RK, Yi M, Lemon SM. DDX6 (Rck/p54) is required for efficient hepatitis C virus replication but not for internal ribosome entry site-directed translation. *J Virol* 2010; 84:6810-6824.
- [144] Berezhna SY, Supekova L, Sever MJ, Schultz PG, Deniz AA. Dual regulation of hepatitis C viral RNA by cellular RNAi requires partitioning of Ago2 to lipid droplets and P-bodies. *RNA* 2011; 17:1831-1845.
- [145] Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:3193-3198.
- [146] Roberts AP, Doidge R, Tarr AW, Jopling CL. The P body protein LSM1 contributes to stimulation of hepatitis C virus translation, but not replication, by microRNA-122. *Nucleic Acids Res* 2014; 42:1257-1269.
- [147] Huys A, Thibault PA, Wilson JA. Modulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation by DDX6 and miR-122 are mediated by separate mechanisms. *PLoS One* 2013; 8:e67437.
- [148] Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M *et al.* Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J Virol* 2011; 85:6882-6892.
- [149] Perez-Vilaro G, Scheller N, Saludes V, Diez J. Hepatitis C virus infection alters P-body composition but is independent of P-body granules. *J Virol* 2012; 86:8740-8749.
- [150] White JP, Lloyd RE. Regulation of stress granules in virus systems. *Trends Microbiol* 2012; 20:175-183.
- [151] Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I *et al.* Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J Biochem* 2006; 139:921-930.
- [152] Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, Scott MJ *et al.* Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J Gen Virol* 2010; 91:122-132.

- [153] Garaigorta U, Heim MH, Boyd B, Wieland S, Chisari FV. Hepatitis C virus (HCV) induces formation of stress granules whose proteins regulate HCV RNA replication and virus assembly and egress. *J Virol* 2012; 86:11043-11056.
- [154] Ruggieri A, Dazert E, Metz P, Hofmann S, Bergeest JP, Mazur J *et al.* Dynamic oscillation of translation and stress granule formation mark the cellular response to virus infection. *Cell Host Microbe* 2012; 12:71-85.
- [155] Wieland S, Makowska Z, Campana B, Calabrese D, Dill MT, Chung J *et al.* Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. *Hepatology* 2014; 59:2121-2130.
- [156] Keskinen P, Nyqvist M, Sareneva T, Pirhonen J, Melen K, Julkunen I. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* 1999; 263:364-375.
- [157] Zhai Y, Zhong Z, Chen CY, Xia Z, Song L, Blackburn MR *et al.* Coordinated changes in mRNA turnover, translation, and RNA processing bodies in bronchial epithelial cells following inflammatory stimulation. *Mol Cell Biol* 2008; 28:7414-7426.
- [158] Schvarcz R, Weiland O, Wejstal R, Norkrans G, Fryden A, Foberg U. A randomized controlled open study of interferon alpha-2b treatment of chronic non-A, non-B posttransfusion hepatitis: no correlation of outcome to presence of hepatitis C virus antibodies. *Scand J Infect Dis* 1989; 21:617-625.
- [159] European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; 55:245-264.
- [160] Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik Mark J. *Inmunbiología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Segunda ed, 2003.
- [161] Fox BA, Sheppard PO, O'Hara PJ. The role of genomic data in the discovery, annotation and evolutionary interpretation of the interferon-lambda family. *PLoS One* 2009; 4:e4933.
- [162] Neumann-Haefelin C, Thimme R. Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 369:243-262.
- [163] Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML *et al.* IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41:1100-1104.

- [164] Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N *et al.* Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41:1105-1109.
- [165] Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y *et al.* Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 139:499-509.
- [166] Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, Nischalke HD *et al.* Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 54:859-865.
- [167] Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W *et al.* Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:7034-7039.
- [168] McGilvray I, Feld JJ, Chen L, Pattullo V, Guindi M, Fischer S *et al.* Hepatic cell-type specific gene expression better predicts HCV treatment outcome than IL28B genotype. *Gastroenterology* 2012; 142:1122-1131 e1121.
- [169] Hamming OJ, Terczynska-Dyla E, Vieyres G, Dijkman R, Jorgensen SE, Akhtar H *et al.* Interferon lambda 4 signals via the IFNlambda receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *EMBO J* 2013; 32:3055-3065.
- [170] Bibert S, Roger T, Calandra T, Bochud M, Cerny A, Semmo N *et al.* IL28B expression depends on a novel TT/-G polymorphism which improves HCV clearance prediction. *J Exp Med* 2013; 210:1109-1116.
- [171] Aka PV, Kuniholm MH, Pfeiffer RM, Wang AS, Tang W, Chen S *et al.* Association of the IFNL4-DeltaG Allele With Impaired Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus. *J Infect Dis* 2014; 209:350-354.
- [172] Nozawa Y, Umemura T, Katsuyama Y, Shibata S, Kimura T, Morita S *et al.* Genetic polymorphism in IFNL4 and response to pegylated interferon-alpha and ribavirin in Japanese chronic hepatitis C patients. *Tissue Antigens* 2014; 83:45-48.
- [173] Bibert S, Wojtowicz A, Taffe P, Manuel O, Bernasconi E, Furrer H *et al.* The IFNL3/4 DeltaG variant increases susceptibility to cytomegalovirus retinitis among HIV-infected patients. *AIDS* 2014; 28:1885-1889.
- [174] Manuel O, Wojtowicz A, Bibert S, Mueller NJ, van Delden C, Hirsch HH *et al.* Influence of IFNL3/4 polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation. *J Infect Dis* 2015; 211:906-914.

- [175] Lang Kuhs KA, Kuniholm MH, Pfeiffer RM, Chen S, Desai S, Edlin BR *et al.* Interferon Lambda 4 Genotype Is Not Associated with Recurrence of Oral or Genital Herpes. *PLoS One* 2015; 10:e0138827.
- [176] Jouvin-Marche E, Macek Jilkova Z, Thelu MA, Marche H, Fugier E, Van Campenhout N *et al.* Lymphocytes degranulation in liver in hepatitis C virus carriers is associated with IFNL4 polymorphisms and ALT levels. *J Infect Dis* 2014; 209:1907-1915.
- [177] Galmozzi E, Aghemo A. Nonsynonymous variant Pro70Ser (rs117648444) in IFNL4 gene identifies carriers of the rs368234815 DeltaG allele with higher HCV RNA decline during the first 4 weeks of pegylated interferon and ribavirin therapy in HCV-1 patients. *J Clin Virol* 2014; 59:274-275.
- [178] Terczynska-Dyla E, Bibert S, Duong FH, Krol I, Jorgensen S, Collinet E *et al.* Reduced IFNLambda4 activity is associated with improved HCV clearance and reduced expression of interferon-stimulated genes. *Nat Commun* 2014; 5:5699.
- [179] Franco S, Aparicio E, Parera M, Clotet B, Tural C, Martinez MA. IFNL4 ss469415590 variant is a better predictor than rs12979860 of pegylated interferon-alpha/ribavirin therapy failure in hepatitis C virus/HIV-1 coinfecting patients. *AIDS* 2014; 28:133-136.
- [180] Stattermayer AF, Strassl R, Maieron A, Rutter K, Stauber R, Strasser M *et al.* Polymorphisms of interferon-lambda4 and IL28B - effects on treatment response to interferon/ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39:104-111.
- [181] O'Brien TR, Pfeiffer RM, Paquin A, Lang Kuhs KA, Chen S, Bonkovsky HL *et al.* Comparison of functional variants in IFNL4 and IFNL3 for association with HCV clearance. *J Hepatol* 2015; 63:1103-1110.
- [182] Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M *et al.* A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 2010; 328:710-722.
- [183] Prufer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S *et al.* The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* 2014; 505:43-49.
- [184] Simonti CN, Vernot B, Bastarache L, Bottinger E, Carrell DS, Chisholm RL *et al.* The phenotypic legacy of admixture between modern humans and Neandertals. *Science* 2016; 351:737-741.



- [185] Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology. Ancient Genome Browser. Disponible en: <https://bioinf.eva.mpg.de/jbrowse/?loc=1%3A99692221..149542345&tracks=&highlight=>. Fecha de acceso: 25 de julio de 2016.
- [186] Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T *et al.* Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 139:1577-1585, 1585 e1571-1573.
- [187] Charlton MR, Thompson A, Veldt BJ, Watt K, Tillmann H, Poterucha JJ *et al.* Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2011; 53:317-324.
- [188] Lange CM, Moradpour D, Doeiring A, Lehr HA, Mullhaupt B, Bibert S *et al.* Impact of donor and recipient IL28B rs12979860 genotypes on hepatitis C virus liver graft reinfection. *J Hepatol* 2011; 55:322-327.
- [189] Coto-Llerena M, Crespo G, Gonzalez P, Koutsoudakis G, Miquel R, Navasa M *et al.* Determination of IL28B polymorphisms in liver biopsies obtained after liver transplantation. *J Hepatol* 2012; 56:355-358.
- [190] Jacobson IM, Pawlotsky JM, Afdhal NH, Dusheiko GM, Forns X, Jensen DM *et al.* A practical guide for the use of boceprevir and telaprevir for the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 2012; 19 Suppl 2:1-26.
- [191] Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for Study of Liver D. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011; 54:1433-1444.
- [192] European Association for Study of L. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatol* 2015; 63:199-236.
- [193] Panel AIHG. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSa recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 2015; 62:932-954.
- [194] Hígado AEpeEd. Guías AEEH/SEIMC de manejo de la Hepatitis C. Madrid: Asociación Española para el Estudio del Hígado; 2016.



- [195] Renet S, Chaumais MC, Antonini T, Zhao A, Thomas L, Savoure A *et al.* Extreme Bradycardia After First Doses of Sofosbuvir and Daclatasvir in Patients Receiving Amiodarone: 2 Cases Including a Rechallenge. *Gastroenterology* 2015; 149:1378-1380 e1371.
- [196] Padegimas A, Forde KA, Goldberg LR, Birati EY. Myo-pericarditis secondary to ledipasvir-sofosbuvir therapy. *J Hepatol* 2016; 64:1196-1198.
- [197] Zeisel MB, Crouchet E, Baumert TF, Schuster C. Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection. *Viruses* 2015; 7:5659-5685.
- [198] Rouvière H., A. D. ANATOMÍA HUMANA. 9ª ed. Barcelona: Masson S.A., 1987.
- [199] Geller S. A., M. PL. Biopsy Interpretation of the Liver, 2nd Edition: Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2009.
- [200] Jonas S, Izaurralde E. The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev* 2013; 27:2628-2641.
- [201] Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 2005; 11:371-382.
- [202] Moreau M, Riviere B, Vegna S, Aoun M, Gard C, Ramos J *et al.* Hepatitis C viral proteins perturb metabolic liver zonation. *J Hepatol* 2015; 62:278-285.
- [203] Kramer B, Nischalke HD, Boesecke C, Ingiliz P, Voigt E, Mauss S *et al.* Variation in IFNL4 genotype and response to interferon-based therapy of hepatitis C in HIV-positive patients with acute and chronic hepatitis C. *AIDS* 2013; 27:2817-2819.
- [204] Meissner EG, Bon D, Prokunina-Olsson L, Tang W, Masur H, O'Brien TR *et al.* IFNL4-DeltaG genotype is associated with slower viral clearance in hepatitis C, genotype-1 patients treated with sofosbuvir and ribavirin. *J Infect Dis* 2014; 209:1700-1704.

## 7. ANEXOS



7.1. Anexo I

**Artículo:**

***“Hepatitis C virus infection inhibits P-body granule formation in human livers”***

Gemma Pérez Vilaró\*, Carlos Fernández Carrillo\*, Laura Mensa, Rosa Miquel, Xavier Sanjuan, Xavier Forns, Sofía Pérez del Pulgar y Juana Díez.

*Journal of Hepatology* 2015 Apr;62(4):785-90 (DOI 10.1016/j.jhep.2014.11.018).

(\*) Los dos primeros autores comparten primera autoría.

Author's personal copy

Research Article



EASL | JOURNAL OF HEPATOLOGY

Viral Hepatitis

## Hepatitis C virus infection inhibits P-body granule formation in human livers

Gemma Pérez-Vilaró<sup>1,†</sup>, Carlos Fernández-Carrillo<sup>2,†</sup>, Laura Mensa<sup>2</sup>, Rosa Miquel<sup>3</sup>,  
Xavier Sanjuan<sup>4,5</sup>, Xavier Forns<sup>2</sup>, Sofia Pérez-del-Pulgar<sup>2,\*,‡</sup>, Juana Díez<sup>1,\*,‡</sup>

<sup>1</sup>Molecular Virology, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Liver Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Pathology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Scientific and Technical Services, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Advanced Light Microscopy Unit, Center for Genomic Regulation, Barcelona, Spain

See Editorial, pages 756–758

**Background & Aims:** Decoding the myriad of interactions that hepatitis C virus (HCV) establishes with infected cells is mandatory to obtain a complete understanding of HCV biology and its associated pathogenesis. We and others have previously found that HCV infection disrupts the formation of P-bodies in cell culture. These are cytoplasmic RNA granules with key roles in post-transcriptional regulation of gene expression. Therefore, P-body disruption might have consequences beyond viral propagation. However, whether P-body disruption occurs also *in vivo* is unknown. Aim of this study was to address this important issue. **Methods:** Formalin-fixed paraffin-embedded liver biopsies from four groups of patients (healthy donors, patients with non-virus related liver inflammation, HCV- and HBV-infected patients) were immunostained to detect DDX6 and Dcp1, two core P-body components. Changes in the localization of these proteins were assessed by confocal microscopy.

**Results:** HCV specifically inhibited P-body formation in hepatocytes from human livers regardless of viral genotype, inflammation grade or whether the infection was recent or long established. Importantly, this alteration was reversed once HCV was eliminated by therapy. Furthermore, we observed *in vivo* an unexpected heterogeneity in P-body composition, which might reflect functional specializations.

**Conclusions:** This is the first comprehensive *in vivo* P-body analysis that links a pathogenic condition to P-body alterations. Because of their role in gene expression, the alteration of

P-bodies should be further studied to understand fully complex HCV-associated pathologies.

© 2014 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Hepatitis C virus (HCV) remains a major threat for human health. Around 130–170 million people worldwide are chronically infected and at high risk to develop liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. There is no vaccine against HCV and the recently approved treatments, although increasingly effective, are genotype specific, expensive, and present multiple side effects and contraindications [2,3]. Thus, it is of interest to expand the therapy options against HCV. For this reason, it is necessary to gain a deeper knowledge of the HCV life cycle.

All steps of the HCV life cycle involve interactions between few HCV components and a myriad of host factors. Over the last years, major advances have been made in the identification of such interactions using a robust HCV cell culture system that combines Huh7 hepatoma cell lines [5] with a virus strain isolated from a patient with fulminant hepatitis, a rare event in HCV infections [4]. However, although very useful, this is an artificial system that does not recapitulate the host environment faced by HCV in chronic infected livers. Moreover, Huh7 cells are transformed cells with an impaired innate antiviral response [6]. Consequently, *in vivo* studies in infected human livers are essential to determine the relevance of identified host-HCV interactions.

Cell compartmentalization ensures the timely and quantitative provision of molecules in the cytoplasm of eukaryotic cells. These compartments include the more classical membrane organelles such as the endoplasmic reticulum, as well as the more recently identified membrane-less RNA granules named processing-bodies (P-bodies). By using the HCV cell culture system we and others have shown that HCV not only manipulates host membranes, but also P-bodies [7,8]. P-bodies are involved in post-transcriptional regulation of gene expression. They are highly dynamic and contain translationally silent mRNAs

Keywords: P-bodies; HCV; *in vivo*; Liver.

Received 22 September 2014; received in revised form 28 October 2014; accepted 6 November 2014; available online 21 November 2014

<sup>†</sup> DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.030>.

\* Corresponding authors. Addresses: Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, Rossellón 149-153, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x2093; fax: +34 933129405 (S. Pérez-del-Pulgar). Molecular Virology Group, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Doctor Aiguader, 88, 08003 Barcelona, Spain. Tel.: +34 933 160 862; fax: +34 933 160 901 (J. Díez). E-mail addresses: [sofiapp@clinic.ub.es](mailto:sofiapp@clinic.ub.es) (S. Pérez-del-Pulgar), [juana.diez@upf.edu](mailto:juana.diez@upf.edu) (J. Díez).

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>‡</sup> These authors share senior authorship.

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; P-bodies, processing bodies; HBV, hepatitis B virus.



Journal of Hepatology 2015 vol. 62 | 785–790

## Research Article

together with multiple proteins belonging to the mRNA decay and silencing machineries [9,10]. Once in P-bodies, mRNAs can be either degraded or stored for a later return into translation [11–13]. To efficiently translate and replicate its RNA genome, HCV hijacks the core P-body components PatL1, Lsm1-7, and DDX6 (also referred to as Rck/p54), which are required for P-body formation [14]. This is associated with a significant reduction in the number of P-bodies within infected cells, presumably by keeping the required components away from participating in P-body formation (PatL1, Lsm1-7, and DDX6 expression levels are not affected) [7,8]. Alterations in P-body composition and formation might have consequences *in vivo* beyond HCV propagation. Indeed, such alterations not only have been connected to other viral infections, but also to stress conditions and to cancer [15–19]. However, as for HCV, all these connections have been derived from indirect evidence and cell culture studies.

Here we show that HCV specifically decreases P-body abundance in hepatocytes from human livers. This is the first *in vivo* direct link between a pathogenic condition and P-body alterations.

## Materials and methods

## Patients

A total of 55 patients were selected for this study, all of them attending the Hospital Clinic of Barcelona between 2002 and 2013. All patients provided written informed consent to use their liver samples. Our study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona, in accordance with the guidelines set forth in the 1975 Declaration of Helsinki. Liver biopsies were performed from patients when clinically indicated. Aiming at assessing changes in P-bodies during HCV infection, we studied 19 HCV chronically-infected immunocompetent patients with a liver biopsy done before antiviral treatment (Table 1). Most of these patients showed typical histological features of chronic hepatitis with variable degree of periportal and/or lobular necroinflammation. For HCV-negative control group, 10 healthy donors for living donor liver

transplantation (designated as healthy donors in the main text) were selected. To compare HCV infection with another viral hepatitis, we also enrolled 8 chronically hepatitis B virus (HBV)-infected immunocompetent patients with a liver biopsy performed before antiviral treatment. Most of the HBV-infected patients showed histological features of chronic hepatitis. In order to address a possible influence of inflammation *per se* on P-bodies, we selected 10 HCV- and HBV-negative liver transplant (LT) patients showing inflammatory changes at the liver biopsy due to non-viral causes, mainly transplant rejection. Most of the non-viral LT patients had portal lymphoid inflammatory infiltrates associated with variable lobular inflammation. The clinical and histological characteristics of the 3 control groups are summarized in Supplementary Table 1. To test the reversibility of P-body changes after HCV clearance, we also selected 3 patients who received antiviral treatment after LT and achieved a sustained virological response (demonstrated by negative PCR tests immediately and at 6 months after treatment). In this group, liver biopsies were obtained before and after HCV clearance. To assess P-body changes in acute HCV infection, we selected 3 patients with hepatitis C recurrence after LT who were biopsied during acute phase hepatitis (0.5 and 6 months after LT). Colocalization studies with HCV core protein and DDX6 were performed in biopsies obtained from 2 patients with HCV recurrence after LT and very high viral load (7.7 and 8.0 log<sub>10</sub> IU/ml, respectively).

## Histopathological processing and diagnostic analysis of liver tissue samples

Tissue specimens were formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) and stained with hematoxylin-eosin and Mason's trichrome as routinely done for diagnostic purposes in the Pathology Department of the Hospital Clinic of Barcelona. Samples were analyzed by an expert liver pathologist (RM). Chronic viral hepatitis was graded and staged by the METAVIR score system [20]. Routine methods and scoring systems were used to characterize histopathological findings according to other specific clinical conditions (e.g. Banff recommendations for rejection; Supplementary Table 1).

## Indirect immunofluorescence

Five-micrometer sections were cut from paraffin blocks and mounted onto charged slides. The slides were heated overnight at 37 °C and then subjected to antigen retrieval using the PT Link automated system (Dako, Glostrup, Denmark). Antigen retrieval conditions were high pH buffer, no preheat mode, target retrieval mode at 97 °C for 20 min. The sections were afterwards blocked with phosphate-buffered saline (PBS)/10% goat serum (Jackson ImmunoResearch, PA,

**Table 1. Baseline characteristics of immunocompetent patients with chronic hepatitis C.** All patients (n = 19) were biopsied before treatment as clinically indicated in order to assess liver injury and fibrosis stage (METAVIR grade and stage, respectively). In this group, no specific association was found between P-body number and clinical parameters.

Patient	Age (years)	Gender (M/F)	HCV genotype	Viral load (log <sub>10</sub> IU/ml)	AST/ALT (IU/ml)	METAVIR grade	METAVIR stage
P1	35	M	4	5.22	71/155	A2	F2
P2	36	M	1b	5.97	33/48	A0	F0
P3	54	F	1a	5.24	71/54	A1	F2
P4	45	M	1b	5.01	30/36	A0	F0
P5	55	M	1b	5.05	152/203	A1	F4
P6	65	F	1b	5.79	73/94	A1	F2
P7	20	F	1b	4.40	66/158	A1	F2
P8	37	M	1b	6.04	114/262	A1	F2
P9	43	F	1b	5.18	67/138	A1	F1
P10	33	M	3	5.77	40/64	A2	F4
P11	55	F	1b	6.03	73/60	A1	F1
P12	23	F	1b	3.04	31/69	A1	F0
P13	51	M	1b	6.33	39/70	A0	F1
P14	66	M	1b	5.72	227/322	A2	F3
P15	55	M	1a	6.31	73/121	A2	F2
P16	29	M	4	5.17	39/45	A0	F0
P17	52	M	1b	6.72	144/196	A2	F4
P18	46	F	4	5.42	60	A1	F2
P19	47	M	2	2.33	45	A1	F2

M/F, male/female; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.



## JOURNAL OF HEPATOLOGY

USA) during 30 min. Incubation with primary antibodies was performed at room temperature during 120 min. The primary antibodies used were 5 µg/ml rabbit polyclonal anti-DDX6/rck (p54) (MBL, Nagoya, Japan), 1.3 µg/ml mouse monoclonal IgG1 anti-DDX6 3D2 (Sigma-Aldrich, MO, USA), 0.8 µg/ml mouse monoclonal IgG2a anti-Dcp1A 3G4 (Abnova, Taipei, Taiwan) and 1 µg/ml mouse monoclonal IgG1 anti-core C7-50 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). After incubation with the primary antibodies, sections were washed three times with PBS and incubated with the secondary antibody for 1 h at room temperature. The secondary antibodies used were 2 µg/ml Alexa Fluor® 647 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, CA, USA). After the second incubation, 3 additional washes with PBS were performed and slides were incubated for 5 min with 1 µg/ml DAPI (Sigma-Aldrich, MO, USA) followed by three final washes with PBS and one with deionized water. Finally, samples were mounted with Prolong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen, CA, USA).

## Confocal imaging and data analysis

Images were acquired with a Leica TCS SP5 confocal microscope using a 63× 1.4-NA PL APO objective (Leica Microsystems GmbH). For each liver biopsy 10 different non-overlapping fields were analyzed. Portal spaces were systematically excluded, avoiding areas of high lymphocyte concentration or poor DAPI quality staining. In total, more than 200 hepatocytes were analyzed per biopsy. Image processing and analysis to obtain the number and size of DDX6- and Dcp1-containing P-bodies was performed with Fiji software [21]. Areas with liver sinusoids and/or lipofuscin aggregates were excluded from the analysis by masking them. The resulting images were processed by using a difference of Gaussians filter to enhance structures within the range of the two Gaussians (sigma 0.5 and 2). Filtered images were subsequently thresholded for P-body particles segmentation and counting. The number of hepatocytes per field was obtained by counting nuclei within a specified range in size (500–5000 pixels) and circularity (0.85–1.00) and final values for P-body counts per hepatocyte were obtained from relating the number of P-bodies in each image to the number of hepatocytes. In the indicated experiments, Z-stacks at the optimal Nyquist axial step size (0.13 µm) from at least 30 randomly selected cells under each condition were collected. Stacks were analyzed to obtain P-body numbers in a similar way as described above, yet using tools to process, threshold and count volumes instead of areas. To perform 3D reconstructions, Z-stacks were deconvolved using Huygens Essential 4.1 software (Scientific Volume Imaging BV, Hilversum, The Netherlands) and visualized with isosurfaces using Imaris 64x 7.6.4 software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland).

## Statistical analysis

Mann-Whitney *U* test was performed when comparing quantitative variables in unpaired groups. Wilcoxon signed-rank test was used to compare quantitative variables in paired groups. A two-tailed *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Data were analyzed with SPSS Statistics 20 (IBM) and Prism 5.01 (GraphPad) software.

## Results

## HCV infection specifically decreases P-body abundance in livers from chronically infected patients

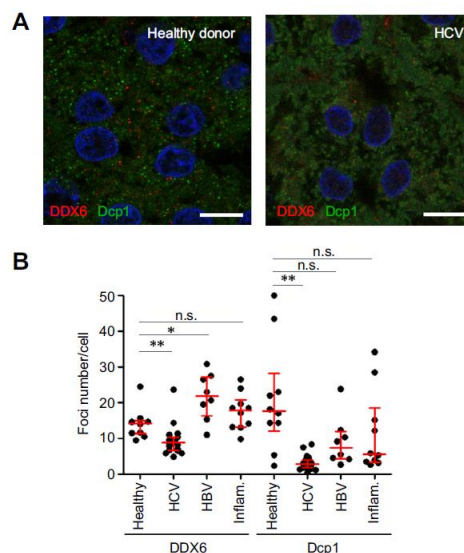
We have previously reported that HCV utilizes P-body components to propagate and induce granule disruption in cell culture [7,14]. These *in vitro* results encouraged us to investigate whether HCV infection affects P-body formation in the liver of chronically infected patients. For this, formalin-fixed paraffin-embedded liver biopsies from HCV-infected patients (*n* = 19, Table 1) and healthy donors (*n* = 10) were double immunostained to detect the two core P-body components DDX6 and Dcp1. P-body detection was assessed by confocal microscopy (Fig. 1A). Regardless of the infecting HCV genotype (1a, 1b, 2, 3 or 4) or the inflammation grade, the abundance of P-bodies containing DDX6 and Dcp1 were reduced by ~2- and ~10-fold, respectively, in hepatocytes from HCV-infected patients relative to hepatocytes from healthy donors (Fig. 1B). The number of Dcp1-positive P-bodies in the

biopsies from healthy individuals exhibited a wide variation among samples that was narrowed down in the presence of HCV infection.

To determine whether the observed alterations were HCV-specific, we included in our study liver biopsies from patients chronically infected with HBV (*n* = 8) and from patients with non-virus related inflammatory changes (*n* = 10). The first group of patients allowed us to determine whether another virus infection that targets the liver could also lead to P-body disruption, while the second group allowed us to address the putative role of liver inflammation in P-body alterations. Importantly, no decrease in the number of P-bodies containing DDX6 was observed in liver biopsies from HBV-infected patients or with non-virus related inflammatory changes. Likewise, the values obtained for P-bodies containing Dcp1 in these patients were dispersed and no significant differences were observed when compared to healthy donors (Fig. 1B). Thus *in vivo* HCV infection specifically decreases P-body abundance.

## The effect of HCV on P-body disruption occurs in both acute and chronic infections and is reversed once HCV is eliminated by therapy

To assess whether a reduced P-body abundance is reversibly linked to HCV infection, we longitudinally analysed P-bodies in liver biopsies from chronically infected patients before and after



**Fig. 1.** HCV infection specifically decreases the number of P-bodies compared with healthy donors. Hepatic tissue was stained with antibodies to detect DDX6 (red) and Dcp1 (green). Nuclei were visualized using DAPI (blue). (A) Representative pictures from healthy donors and HCV-infected patients. Scale bar, 10 µm. (B) Quantification of DDX6- and Dcp1-containing P-bodies in healthy donors (Healthy, *n* = 10), HCV-infected (HCV, *n* = 19), HBV-infected (HBV, *n* = 8), and HCV-negative patients with liver inflammation (Inflam., *n* = 10). Dots indicate the median value per biopsy, horizontal red lines indicate the median for each group of patients and vertical red lines the interquartile range. Statistical significance was tested with Mann-Whitney *U* test. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.005; n.s., not significant.

## Research Article

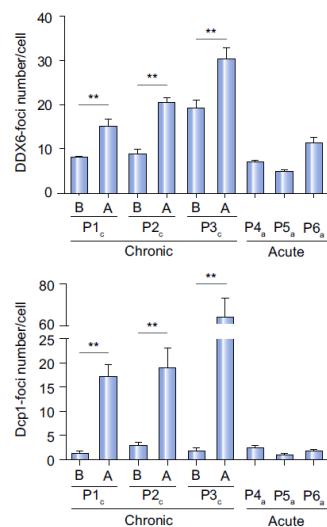
antiviral treatment ( $n = 3$ ), once a sustained virological response and thus viral clearance had been achieved. In all cases, the number of P-bodies per hepatocyte containing DDX6 or Dcp1 increased upon viral clearance, reaching levels comparable to the ones found in healthy donors (Fig. 2). Of note, although the number of P-bodies per hepatocyte seemed patient specific, the ratio between P-body numbers obtained before and after antiviral treatment was similar among the three patients analysed.

To determine whether the HCV-induced changes in P-bodies from hepatocytes require a chronic state of the viral infection or also occur in acute states, we analyzed biopsies from liver transplant patients with acute recurrent hepatitis C ( $n = 3$ ), which mimics the initial phase of the infection. In these biopsies the number of P-bodies that contained DDX6 or Dcp1 was similar to the ones found in chronically infected patients (Fig. 2).

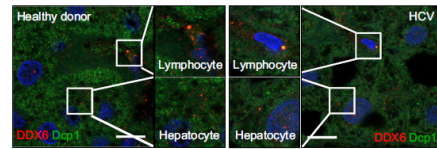
Collectively, although the amount of samples was limited, these results support that HCV infection, acute or chronic, specifically decreases P-body abundance and that this decrease is reversed once HCV is eliminated by therapy.

*In vivo, P-body granules in somatic cells are more heterogeneous than previously anticipated*

The composition and formation of P-bodies in somatic cells *in vivo* is mostly unexplored since available studies have focused on cell culture systems [11,12]. Interestingly, analyses of the liver images from confocal microscopy revealed unexpected peculiar-



**Fig. 2. P-body disruption occurs in acute and chronic HCV infections and is reversed once HCV is eliminated.** Hepatic tissue was stained as described for Fig. 1A, and DDX6- and Dcp1-containing P-bodies were quantified in three HCV-chronic infected patients (P1<sub>c</sub>, P2<sub>c</sub>, and P3<sub>c</sub>) before (B) and after (A) antiviral treatment, as well as in three HCV-acute infected patients (P4<sub>a</sub>, P5<sub>a</sub>, and P6<sub>a</sub>). Displayed are the median values for each patient; error bars indicate the standard error of the mean. Statistical significance was tested with Wilcoxon test. \*\* $p < 0.005$ .



**Fig. 3. Colocalization of DDX6 and Dcp1 in hepatocytes and parenchyma-infiltrating lymphocytes.** Hepatic tissue was stained in healthy donors and HCV-infected patients with antibodies to detect DDX6 (red) and Dcp1 (green). Nuclei were visualized using DAPI (blue). Scale bar: 10  $\mu$ m. Indicated areas in the images are magnified in the central columns.

ities. There was no colocalization of DDX6 and Dcp1 in hepatocytes *in vivo* although such colocalization is commonly observed in hepatoma cell lines, like Huh7.5, used to study HCV *in vitro* [7]. This lack of colocalization was hepatocyte-specific since parenchyma-infiltrating lymphocytes of the same individual showed a strong colocalization of DDX6 and Dcp1 (Fig. 3). Thus, *in vivo*, P-body granules seem to be more heterogeneous than previously anticipated *in vitro*, and show cell-type specificity.

*3D single cell analyses corroborates the P-body number decrease observed at a global level in HCV-infected livers*

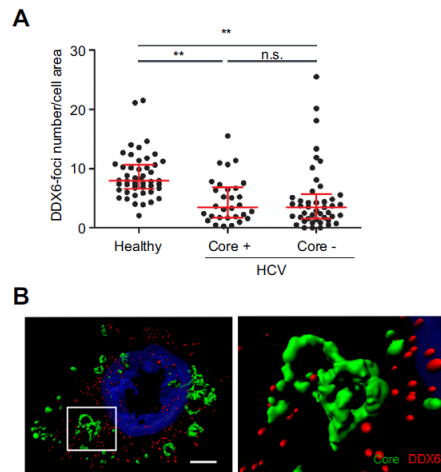
Confocal analysis allows the acquisition of single cell sections. To eliminate the possibility that the P-body changes in HCV chronically infected livers were due to alterations in P-body intracellular distribution, we carried out detailed single-cell 3D analyses. Liver biopsies from patients with severe HCV recurrence after liver transplantation were double immunostained for the HCV core protein and the P-body component DDX6. Double staining with the HCV core antigen ensured that only HCV-infected cells were analyzed. The use of biopsies from liver transplant patients with high viral load and, therefore, high HCV antigen levels allowed us to overcome the experimental limitations of low abundance of HCV antigens in infected cells and the unfavorable imaging properties of the liver [22]. Z-stack images were obtained and P-body abundance and intracellular localization was evaluated and compared with that in hepatocytes from healthy donors. DDX6-containing P-bodies were reduced by ~2-fold in core-positive hepatocytes from HCV-infected patients relative to hepatocytes from healthy donors (Fig. 4A). This value parallels the one obtained with single stack analyses where infected and non-infected hepatocytes are indistinguishable (Fig. 1B). In line with this, when P-bodies were quantified in core-negative hepatocytes, the average amount of DDX6-containing P-bodies per cell area was similar to the one in core-positive hepatocytes. In addition, as it has been observed previously [22], the 3D reconstruction of HCV-infected hepatocytes showed HCV core proteins forming ring-like structures that surround lipid droplets, the site of viral RNA encapsidation. In contrast to studies in cell culture [8], DDX6 did not colocalize with HCV capsid proteins (Fig. 4B).

## Discussion

*In vivo* studies are essential to understand deeply the complex interaction of HCV with the infected hepatocyte and the



## JOURNAL OF HEPATOLOGY



**Fig. 4.** 3D single cell analysis validates DDX6-containing P-body decrease observed at a global level. Hepatic tissue was stained with antibodies to detect DDX6 (red) and the viral protein core (green). Nuclei were visualized using DAPI (blue). (A) DDX6 P-body number was quantified at a single cell level along the Z-axis in healthy donors (Healthy,  $n = 4$ ) and in HCV core-positive (Core+) and core-negative (Core-) cells from HCV-infected patients (HCV,  $n = 2$ ). Horizontal red lines indicate the median for each group of patients and vertical red lines show interquartile range. (B) Z-stack images were 3D-segmented. Colocalization between both markers was assessed in HCV-infected patients. Statistical significance was tested with Mann-Whitney U test. \*\* $p < 0.005$ ; n.s., not significant. Scale bar: 3  $\mu$ m.

associated pathogenesis. In this manuscript we report that HCV infection impairs P-body formation in hepatocytes from human livers regardless of viral genotype, inflammation grade or whether the infection is recent or long established. The observed alterations are HCV-specific since no significant P-body reduction was observed in chronically HBV-infected patients or in patients with non-viral related hepatic inflammatory changes. Furthermore, the number of P-bodies was restored once the virus had been eliminated by therapy, strengthening the notion that the presence of HCV is required for P-body disruption to occur. Interestingly, the number of P-bodies per hepatocyte was highly heterogeneous among individuals covering a wide range of values in healthy donors, HBV-infected, and non-viral related liver inflammation patients. Nonetheless, in HCV-infected patients this range was very narrow, indicating that HCV is a decisive factor in P-body formation.

An unexpected observation in our study was the heterogeneous composition displayed by P-bodies *in vivo*. To our knowledge all previous P-body studies in somatic cells have been performed in cell lines. In these studies, colocalization has been observed for DDX6 and Dcp1, two core P-body components widely used to visualize P-bodies [7]. However, no colocalization was observed in hepatocytes from both healthy donors and HCV-infected patients, while lymphocytes surrounding these hepatocytes showed clear colocalization patterns. The variable P-body composition among cell types might reflect different cell regulation requirements [23]. Currently, we do not know if this is a special feature of hepatocytes or it is extended to other cell

types. Another observation in conflict with previous cell culture data was the non-colocalization of DDX6 with the viral core protein. Ariumi *et al.* determined that DDX6, among other P-body components, were hijacked to lipid droplets where they colocalize with the core protein from JFH1 HCV strain [8]. However, with Jc1 HCV strain we failed to observe this colocalization in cell culture [7]. These conflicting results might reflect differences in the dynamics of core and DDX6 interactions. Finally, another interesting observation in hepatocytes is that DDX6-containing and Dcp1-containing P-bodies behave differently under certain conditions. In hepatocytes from HBV-infected patients the number of DDX6-containing P-bodies was significantly increased relative to hepatocytes from healthy donors. In contrast, hepatocytes from HBV-infected patients displayed a tendency to show lower Dcp1-containing P-body numbers when compared to healthy donors. Although the causes of these distinct behaviours remain unknown, they might reflect a specialization in P-body granules. Together, the observed heterogeneity in P-body composition among cell types and within a single cell opens a new level of complexity that might reflect functional specializations, and deserves further exploration.

The HCV-induced reduction in P-body numbers might have profound effects in the biology of the cell. P-body components are in a dynamic equilibrium between their granule and a soluble localization in the cytosol, thus a reduction in the number of P-bodies results in an increase of cytosolic P-body components [24–26]. As P-body components include multiple proteins that control decay and silencing of mRNAs, the transcriptome and translatoe are expected to be deregulated and consequently gene expression altered. In chronic infections, HCV-induced reduction in P-body numbers would result in a long-term alteration of gene expression that might contribute to HCV-associated pathogenesis. In line with this, overexpression of the core P-body component DDX6 has been observed in hepatocellular carcinomas [18]. This overexpression is expected to alter the number of P-bodies.

How and why HCV infection induces P-body disruption is not completely understood. Our data in hepatoma cell lines support the hypothesis that HCV disrupts P-bodies by hijacking or modifying core P-body components required for P-body formation [7,8]. Lsm1-7, Pat1, and DDX6 are three core P-body components with a major role in decapping and decay of cellular mRNAs [27]. HCV needs these factors and redirects them for a role in the viral life cycle to promote HCV RNA translation and replication [14,28]. At the same time, viral reproduction may benefit from the subsequent P-body disruption, since P-bodies have been involved in innate immune responses [16]. Intriguingly, *in vivo*, the HCV-induced reduction in P-bodies was similar in core-positive and core-negative cells (Fig. 4A). Consequently, either very low and undetectable HCV replication is enough to cause P-body disruption or HCV-infected cells induce P-body disruption of surrounding cells by unknown mechanisms. Interestingly, perturbed metabolic zonation in HCV-infected livers has been recently related to this last scenario [29].

In summary, this is the first comprehensive analysis of P-body granules *in vivo* and a direct demonstration of a link between a pathogenic condition and P-body alterations. Incorporating P-bodies into the mechanistic framework of multifaceted disease traits adds another level of complexity that should be considered to understand fully the molecular events causing HCV-induced liver disease and other serious diseases.



## Research Article

## Financial support

JD and GPV were supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2013-44629-R). XF received support in part by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI11/01907), Ministerio de Economía y Competitividad, cofunded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Una manera de hacer Europa. XF and SPP also received a grant from the Roche Organ Transplantation Research Foundation (ROTRF, CI: 442035057). The other authors were supported by grants from the following institutions: CFC from Asociación Española para el Estudio del Hígado, and LM from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad.

## Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declare that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

## Authors' contributions

GPV and CFC designed, performed experiments and analyzed data; CFC collected clinical data; CFC and LM set up conditions for the immunostaining of P-body components in formalin-fixed paraffin-embedded liver biopsies; XS provided technical assistance and acquired images for 3D reconstruction experiments; RM did the histopathological processing and diagnostic analysis of liver tissue samples; JD, SPP and XF supervised all aspects of this study, including design, execution, data analysis, interpretation and manuscript preparation; JD came up with the research idea; XF provided the patient cohort and the clinical samples; JD and GPV wrote the manuscript; all authors contributed to the interpretation and discussion of the results, as well as to the revision of the manuscript.

## Acknowledgements

We thank A. Meyerhans for critically reading the manuscript and for helpful discussions, and T. Pengo for his advice in the design of scripts to analyze the confocal datasets.

## Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.018>.

## References

- [1] Thomas DL. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat Med* 2013;19:850–858.
- [2] Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:482–496.
- [3] Lange CM, Jacobson IM, Rice CM, Zeuzem S. Emerging therapies for the treatment of hepatitis C. *EMBO Mol Med* 2014;6:4–15.
- [4] Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* 2001;64:334–339.
- [5] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791–796.
- [6] Keskinen P, Nyqvist M, Sareneva T, Pirhonen J, Melen K, Julkunen I. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* 1999;263:364–375.
- [7] Perez-Vilaro G, Scheller N, Saludes V, Diez J. Hepatitis C virus infection alters P-body composition but is independent of P-body granules. *J Virol* 2012;86:8740–8749.
- [8] Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, et al. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J Virol* 2011;85:6882–6892.
- [9] Aizer A, Brody Y, Ler LW, Sonenberg N, Singer RH, Shav-Tal Y. The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol Biol Cell* 2008;19:4154–4166.
- [10] Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 2005;169:871–884.
- [11] Anderson P, Kedersha N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:430–436.
- [12] Decker CJ, Parker R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a012286.
- [13] Erickson SL, Lykke-Andersen J. Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *J Cell Sci* 2011;124:293–297.
- [14] Scheller N, Mina LB, Galao RP, Chari A, Gimenez-Barcons M, Noueiry A, et al. Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:13517–13522.
- [15] Beckham CJ, Parker R. P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe* 2008;3:206–212.
- [16] Lloyd RE. Regulation of stress granules and P-bodies during RNA virus infection. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013;4:317–331.
- [17] Blanco FF, Sanduja S, Deane NG, Blackshear PJ, Dixon DA. Transforming growth factor beta regulates P-body formation through induction of the mRNA decay factor tristetraprolin. *Mol Cell Biol* 2014;34:180–195.
- [18] Iio A, Takagi T, Miki K, Naoe T, Nakayama A, Akao Y. DDX6 post-transcriptionally down-regulates miR-143/145 expression through host gene NCR143/145 in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1829:1102–1110.
- [19] Nakagawa Y, Morikawa H, Hirata I, Shiozaki M, Matsumoto A, Maemura K, et al. Overexpression of rck/p54, a DEAD box protein, in human colorectal tumours. *Br J Cancer* 1999;80:914–917.
- [20] Bedossa P, Poyndar T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289–293.
- [21] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676–682.
- [22] Mensa L, Perez-del-Pulgar S, Crespo G, Koutsoudakis G, Fernandez-Carrillo C, Coto-Llerena M, et al. Imaging of hepatitis C virus infection in liver grafts after liver transplantation. *J Hepatol* 2013;59:271–278.
- [23] Jonas S, Izaurralde E. The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev* 2013;27:2628–2641.
- [24] Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 2005;11:371–382.
- [25] Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 2007;27:3970–3981.
- [26] Franks TM, Lykke-Andersen J. TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev* 2007;21:719–735.
- [27] Arribas-Layton M, Wu D, Lykke-Andersen J, Song H. Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochim Biophys Acta* 2013;1829:580–589.
- [28] Jangra RK, Yi M, Lemon SM. DDX6 (Rck/p54) is required for efficient hepatitis C virus replication but not for internal ribosome entry site-directed translation. *J Virol* 2010;84:6810–6824.
- [29] Moreau M, Riviere B, Vegna S, Aoun M, Gard C, Ramos J, et al. Hepatitis C viral proteins perturb metabolic liver zonation. *J Hepatol* 2015;62:278–285.

## 7.1.1. Material suplementario del artículo del Anexo I

**Supplementary Table 1. Baseline characteristics of immunocompetent patients with chronic hepatitis C.** All patients (n= 19) were biopsied before treatment as clinically indicated in order to assess liver injury and fibrosis stage (METAVIR grade and stage, respectively). In this group, no specific association was found between P-bodies number and clinical parameters.

Patient	Age (years)	Gender (M/F)	HCV Genotype	Viral Load (log <sub>10</sub> IU/mL)	AST/ ALT (IU/mL)	METAVIR grade	METAVIR stage
P1	35	M	4	5.22	71/155	A2	F2
P2	36	M	1b	5.97	33/48	A0	F0
P3	54	F	1a	5.24	71/54	A1	F2
P4	45	M	1b	5.01	30/36	A0	F0
P5	55	M	1b	5.05	152/203	A1	F4
P6	65	F	1b	5.79	73/94	A1	F2
P7	20	F	1b	4.40	66/158	A1	F2
P8	37	M	1b	6.04	114/262	A1	F2
P9	43	F	1b	5.18	67/138	A1	F1
P10	33	M	3	5.77	40/64	A2	F4
P11	55	F	1b	6.03	73/60	A1	F1
P12	23	F	1b	3.04	31/69	A1	F0
P13	51	M	1b	6.33	39/70	A0	F1
P14	66	M	1b	5.72	227/322	A2	F3
P15	55	M	1a	6.31	73/121	A2	F2
P16	29	M	4	5.17	39/45	A0	F0
P17	52	M	1b	6.72	144/196	A2	F4
P18	46	F	4	5.42	60	A1	F2
P19	47	M	2	2.33	45	A1	F2

M/F, male/female; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

**Supplementary Table 2. Clinical characteristics among the control groups: healthy donors, HBV-infected and HCV/HBV-negative LT patients with liver inflammation.** All patients were biopsied as clinically indicated.

Patient ID	Control group	Age (years)	Gender (M/F)	IS	AST/ALT (IU/mL)	METAVIR stage	Histopathological diagnosis
P20	Healthy donors (n=10)	30	M	-	28/50	F0	Mild hemosiderosis
P21		30	M	-	21/18	F0	Mild hemosiderosis
P22		53	M	-	28/38	F0	Moderate hemosiderosis
P23		43	F	-	NA	F0	NAD
P24		54	F	-	NA/26	F0	Mild steatosis
P25		46	F	-	12/15	F0	NAD
P26		36	M	-	31/26	F0	Mild steatosis
P27		22	M	-	27/23	F0	Minimal changes
P28		28	M	-	25/33	F0	Mild hemosiderosis
P29		43	F	-	14/8	F0	NAD
P30	HBV (n=8)	27	M	-	231/574	F2	Suggestive of HBV infection
P31		40	M	-	31/44	F1	Suggestive of HBV infection
P32		49	F	-	53/60	F3	Suggestive of HBV infection
P33		37	M	-	48/68	F2	Compatible with HBV
P34		44	M	-	69/70	F3	Suggestive of HBV infection
P35		33	M	-	55/85	F2	Suggestive of HBV infection

## 7. Anexos

P36		48	M	-	93/97	F3	Suggestive of HBV infection
P37		33	M	-	46/61	F1	Suggestive of HBV infection
P38	LT with inflammatory changes (n=10)	69	M	Other	52/73	F0	Steatohepatitis
P39		61	M	FK	11/25	F0	Rejection
P40		54	F	FK	22/20	F0	Unspecific inflammation
P41		31	F	CyS	55/215	F0	Rejection
P42		54	M	CyS	64/168	F1	Rejection
P43		59	M	FK	29/55	F0	Rejection
P44		38	M	FK	213/317	F0	Rejection
P45		69	M	FK	39/39	F0	Autoimmune hepatitis
P46		46	F	Other	43/53	F0	PBC recurrence
P47		67	M	CyS	100/88	F0	Rejection

LT, liver transplant; M/F, male/female; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; IS, immunosuppression regimen; CyS, Cyclosporine A; FK, Tacrolimus; Other, mTOR inhibitor; PBC, primary biliary cirrhosis; NAD, nothing abnormal detected.

7.2. Anexo II

**Artículo:**

***“IFNL4 polymorphism predicts response to hepatitis C treatment after liver transplantation”***

Carlos Fernández Carrillo\*, Mairene Coto Llerena, Patricia González, Gonzalo Crespo, Laura Mensa, Noelia Caro Pérez, Martina Gambato, Miquel Navasa, Xavier Forns y Sofía Pérez del Pulgar.

*Journal of Clinical Virology* 2014 Oct;61(2):282-5. (DOI 10.1016/j.jcv.2014.07.015).



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jcv](http://www.elsevier.com/locate/jcv)

## Short Communication

## IFNL4 polymorphism predicts response to hepatitis C treatment after liver transplantation

Carlos Fernández-Carrillo<sup>1</sup>, Mairene Coto-Llerena<sup>2</sup>, Patricia González, Gonzalo Crespo, Laura Mensa, Noelia Caro-Pérez, Martina Gambato, Miquel Navasa, Xavier Forns, Sofia Pérez-del-Pulgar\*

Liver Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 May 2014

Received in revised form 17 July 2014

Accepted 22 July 2014

## Keywords:

IFNL4

Hepatitis C virus

Interferon treatment

Liver transplantation

Sustained virological response

## ABSTRACT

**Background:** Recent studies in chronic hepatitis C patients have shown that rs368234815 polymorphism nearby IL28B is a better predictor of response to antiviral treatment with pegylated interferon and ribavirin than IL28B polymorphisms (rs12979860 and rs8099917). Its effect could be related to interferon lambda 4 (IFNL4), a protein which seems to confer some paradoxical disadvantages in hepatitis C virus (HCV) immune response.

**Objectives:** To assess the role of IFNL4 rs368234815 polymorphism on the response to antiviral treatment after liver transplantation (LT).

**Study design:** IFNL4 and IL28B polymorphisms were genotyped in 86 HCV-infected LT recipients and in their donors; all patients had undergone antiviral treatment with pegylated interferon and ribavirin after LT.

**Results:** IFNL4 polymorphism strongly correlated with IL28B ones ( $p < 0.001$ ). The favorable IFNL4 genotype (TT/TT) was significantly more frequent among donors than recipients (60% donors vs. 22% recipients,  $p < 0.001$ ). Recipient TT/TT genotype was associated with a higher sustained virological response rate after LT ( $p = 0.024$ ). Nevertheless, the highest sustained virological response frequency was found when both donors and recipients had favorable genotypes (73% vs. 25%,  $p = 0.002$ ), suggesting a role for donor genotype.

**Conclusions:** Our study demonstrates that IFNL4 rs368234815 polymorphism is an important predictor of response to antiviral treatment in the LT setting. These findings warrant further studies on IFNL4 role in immune response against HCV.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** AH, acute hepatitis; CH, cholestatic hepatitis; CSA, cyclosporine A; FCH, fibrosing cholestatic hepatitis; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; HCV, hepatitis C virus; IFNL4, interferon lambda 4; IL28B, interleukin 28 beta; LT, liver transplantation; OR, odds ratio; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; peg-IFN, pegylated interferon; RBV, ribavirin; SNP, single nucleotide polymorphism; SVR, sustained virological response; TAC, tacrolimus.

\* Corresponding author at: Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, Rossellón 149–153, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x2093; fax: +34 933129405.

E-mail addresses: [CFERNANC@clinic.ub.es](mailto:CFERNANC@clinic.ub.es) (C. Fernández-Carrillo), [MCOTO@clinic.ub.es](mailto:MCOTO@clinic.ub.es) (M. Coto-Llerena), [PGONZALE@clinic.ub.es](mailto:PGONZALE@clinic.ub.es) (P. González), [GCRESPO@clinic.ub.es](mailto:GCRESPO@clinic.ub.es) (G. Crespo), [LAURA.MENSA@clinic.ub.es](mailto:LAURA.MENSA@clinic.ub.es) (L. Mensa), [CARO@clinic.ub.es](mailto:CARO@clinic.ub.es) (N. Caro-Pérez), [GAMBATO@clinic.ub.es](mailto:GAMBATO@clinic.ub.es) (M. Gambato), [MNAVASA@clinic.ub.es](mailto:MNAVASA@clinic.ub.es) (M. Navasa), [XFORNS@clinic.ub.es](mailto:XFORNS@clinic.ub.es) (X. Forns), [SOFIAPP@clinic.ub.es](mailto:SOFIAPP@clinic.ub.es) (S. Pérez-del-Pulgar).

<sup>1</sup> Present address: Gastroenterology and Hepatology Department, Puerta de Hierro University Hospital, IDIPHIM, CIBERehd, Calle Manuel de Falla 1, 28222 Majadahonda, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Present address: Hepatology Unit, Department of Biomedicine, University Hospital Basel, Hebelstrasse 20, CH-4031 Basel, Switzerland.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.07.015>  
1386–6532/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Background

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is the main cause of chronic hepatic disease, hepatocellular carcinoma and liver transplantation (LT) in Europe, North and South America, Australia and Japan [1]. Unfortunately, graft infection by HCV is universal if the recipient had detectable viral load at the time of transplant [2]. HCV recurrence after LT usually has an accelerated course which results in reduced graft and recipient survival. Treating patients after LT with pegylated-interferon (peg-IFN) plus ribavirin (RBV) achieves modest outcomes owing to poor tolerance and low response rates [3,4].

Recently, the dinucleotide variant rs368234815 located nearby IL28B and creating the interferon- $\lambda$  protein (IFNL4) has been associated with HCV clearance [5,6]. To date, some studies have addressed the impact of rs368234815 on the response to peg-IFN plus RBV as well as to sofosbuvir-based treatments [5–13]. However,

Please cite this article in press as: Fernández-Carrillo C, et al. IFNL4 polymorphism predicts response to hepatitis C treatment after liver transplantation. J Clin Virol (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.07.015>

the performance of the IFNL4 rs368234815 variant in the LT setting, where the genetic backgrounds of donors and recipients coexist, remains to be elucidated.

## 2. Objectives

The aim of this study was to assess the influence of IFNL4 genotypes on antiviral treatment in the LT context, in correlation with IL28B polymorphisms.

## 3. Study design

### 3.1. Patients, antiviral treatment and clinical definitions

Between 2000 and 2009, 136 patients underwent dual antiviral treatment after LT because of HCV recurrence. From this group, we selected 86 genotype 1 HCV-monoinfected patients, in which tissue samples were available for both recipients and their donors. Patients were treated with peg-IFN  $\alpha$ 2b 1.5 mcg/kg/week and RBV 800–1200 mg/day based on body weight for 48 weeks. Rapid virological response (RVR) was defined as undetectable HCV-RNA at week 4 of antiviral treatment. Early virological response (EVR) was defined as undetectable HCV-RNA at week 12 of antiviral treatment. Sustained virological response (SVR) was defined as undetectable HCV-RNA 24 weeks after the end of treatment.

### 3.2. Samples and genotyping

Genomic DNA of donors and recipients was obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) liver biopsies. These biopsies were performed at the time of LT both for donors (at the moment of reperfusion) and recipients (from the explants) [14,15].

IFNL4 rs368234815 genotypes were determined by direct sequencing (Supplementary Table S1). For quality control, all samples were also genotyped by an independent laboratory (LGC Genomics, Hoddesdon, Herts, UK) using KASP SNP genotyping system, a competitive allele-specific PCR incorporating a FRET quencher cassette.

IFNL4 rs368234815 genotypes were defined as TT/TT, TT/ $\Delta$ G or  $\Delta$ G/ $\Delta$ G, according to previous literature [5]. Genotyping was done in a blind fashion with respect to clinical outcomes. IL28B rs12979860 and rs8099917 genotypes were defined and obtained as previously described [14,15].

### 3.3. Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as median (range). Fisher's exact test was used to calculate relations between categorical variables. Mann–Whitney test was performed when comparing

**Table 1**  
Baseline characteristics of patients before antiviral treatment.

	Study cohort (n = 86)
Gender (males)	56 (65)
Age (years)	58 (30–70)
Baseline viral load (log <sub>10</sub> IU/mL)	6.56 (4.48–9.03)
Genotype (1a/1b)	9 (11)/77 (89)
Fibrosis stage at treatment	
F0–1	16 (18)
F2	23 (27)
F3	12 (14)
F4	5 (6)
CH/FCH	24 (28)
AH	6 (7)
Time from LT to treatment (months)	13 (1–80)
Duration of treatment (weeks)	48 (4–81)
Immunosuppression at treatment (CSA/TAC/antimetabolites)	28 (33)/52 (60)/6 (7)

Quantitative variables are shown as median (range). Qualitative variables are shown as n (%). CH, cholestatic hepatitis; FCH, fibrosing cholestatic hepatitis; AH, acute hepatitis; LT, liver transplantation; CSA, cyclosporine A; TAC, tacrolimus.

quantitative variables (unpaired groups). A two-tailed *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

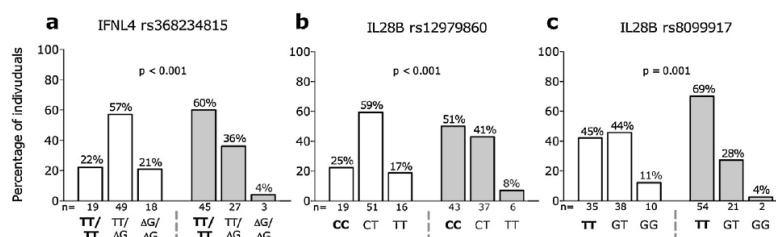
## 4. Results

### 4.1. Patients and antiviral treatment

The baseline characteristics of the 86 patients included in the study are shown in Table 1. Twenty-six patients (30%) reached SVR with antiviral therapy after LT. IFNL4 polymorphism was successfully genotyped in 86 recipients and 75 donors. IL28B rs12979860 was genotyped in all recipient–donor pairs, and rs8099917 in 83 recipients and 77 donors. No association was found between treatment response and any of the clinical variables analyzed, probably due to the sample size.

### 4.2. IFNL4 genotype distribution within LT recipients and their donors

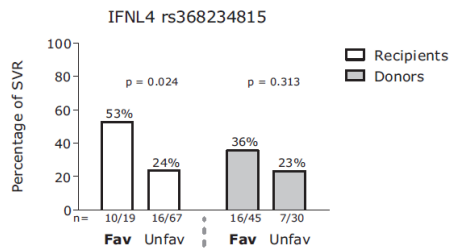
Fig. 1a depicts how IFNL4 genotypes distribution differed significantly between recipients and donors (*p* < 0.001). Recipients displayed a marked enrichment of TT/ $\Delta$ G and  $\Delta$ G/ $\Delta$ G unfavorable genotypes compared with donors: 57% and 21% vs. 36% and 4%, respectively. In contrast, donors showed a significantly higher frequency for the TT/TT favorable genotype than recipients (60% vs. 22%). Since IL28B SNPs are in high linkage disequilibrium with rs368234815 [5], their distributions paralleled IFNL4 genotypes both in donors and recipients (Fig. 1b and c).



**Fig. 1.** Distribution of the three polymorphisms within recipients and their donors. (a) IFNL4 rs368234815, (b) IL28B rs12979860 and (c) IL28B rs8099917. Recipients, white bars; donors, gray bars. Numbers below bars indicate the number of patients (n).

Please cite this article in press as: Fernández-Carrillo C, et al. IFNL4 polymorphism predicts response to hepatitis C treatment after liver transplantation. J Clin Virol (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.07.015>





**Fig. 2.** Sustained virological response after LT in association with IFNL4 genotypes within recipients and their donors. Fav, favorable TT/TT genotype; Unfav, unfavorable TT/deltaG and deltaG/deltaG genotypes. Numbers below bars indicate the number of patients (n).

#### 4.3. IFNL4 polymorphism association with antiviral treatment response

Regarding the response to antiviral treatment after LT, our results showed a significant association between recipient IFNL4 favorable genotype (TT/TT) and SVR compared to unfavorable genotypes (TT/deltaG and deltaG/deltaG) ( $p=0.024$ , Fig. 2). When assessing this polymorphism in donors, we found a higher frequency of SVR in patients receiving a liver from a donor with the favorable genotype (36%) vs. unfavorable genotypes (23%), irrespective of their recipient genotype. However and unlike recipients, this difference was small and did not reach statistical significance ( $p=0.313$ , Fig. 2). Similar results were observed when assessing on treatment response. Recipient IFNL4 genotype was significantly associated with RVR and EVR ( $p=0.033$  and  $p<0.001$ , respectively), while donor genotype was not ( $p=0.642$  for RVR and  $p=0.469$  for EVR).

Nevertheless, since every recipient has a donor, it is not possible to understand the contribution of donor and recipient genetics separately. For this reason, we considered donor–recipient pairs and analyzed how the combination of genotypes in recipients and donors could affect the response to antiviral treatment. As shown in Fig. 3a, the combination of favorable genotypes simultaneously in recipients and their donors was clearly associated with SVR over the other combinations ( $p=0.002$ ). Similar results were obtained for IL28B SNPs rs12979860 and rs8099917 (Fig. 3b and c). Regarding on treatment response after LT, our results showed that the favorable–favorable combination was also consistently associated with RVR and EVR ( $p=0.007$  and  $p=0.001$ , respectively).

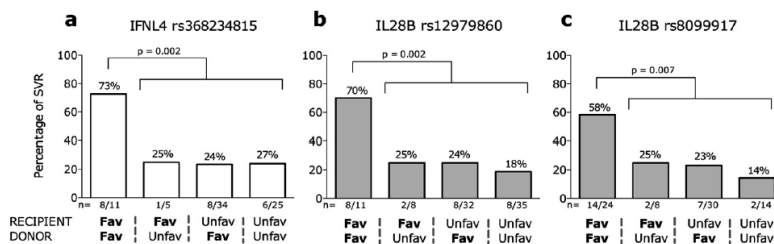
#### 5. Discussion

In our present work we demonstrate that IFNL4 rs368234815 polymorphism has a strong influence on antiviral treatment response after LT. Since this polymorphism is in high linkage disequilibrium with IL28B rs12979860 and rs8099917, the distribution of IFNL4 genotypes strongly correlated with IL28B genotypes. Similarly to IL28B SNPs, recipients showed a higher frequency of unfavorable IFNL4 genotypes when comparing them with donors [14–17]. This is presumably a consequence of selection by an inefficient immune response both during acute infection and antiviral treatment.

In a first analysis, the recipient genotype seemed to play a major role in achieving SVR after LT while donor genotype seemed to have a modest weight. However, the combination of simultaneous favorable genotypes in recipients and donors was significantly associated with on treatment early viral kinetics and SVR after LT: those recipients with favorable IFNL4 genotype, who also received a liver from a donor with the favorable genotype, reached SVR more frequently than those receiving grafts with unfavorable genotypes. These results are in agreement with our current results for IL28B rs12979860 and rs8099917 SNPs, as well as with those previously reported [14–16,18]. In addition, IFNL4 genotypes have been related to on-treatment early viral kinetics in immunocompetent HCV-infected patients under peg-IFN plus RBV treatment [5] and when using direct acting antivirals as sofosbuvir in an interferon-free regimen [13]. It is likely that the clinical impact of IFNL4 on virological response will be lower in countries where interferon-free regimens are available, but this will not be the case in large areas of the world where interferon-based regimens will remain the standard of care.

Our findings support a positive effect of the genetic background of the graft on sensitivity to antiviral treatment following LT and bring out the complexity of the co-existence of two genetic backgrounds when trying to understand HCV–host interactions. LT patients exhibit a mixture of genetic backgrounds where almost all liver parenchymal cell lines come from the donor, while the graft is soon repopulated with recipient-derived cells comprising lymphocytes and even non-lymphoid cells [19–21]. Different mechanisms may operate for rs368234815 polymorphism depending on the cell type [22–24], either immune cells or hepatocytes, which may account for the differential contribution of donors and recipients to antiviral treatment response.

IFNL4 polymorphism has been reported to have a more powerful predictive value than IL28B ones, especially in African-ancestry patients [5,6,9,10]. However, in agreement with a recent work including 754 HCV-chronically infected Caucasian patients [7], we



**Fig. 3.** Combined analysis of IFNL4 and IL28B genotypes from recipient and donor pairs in association with SVR after LT. (a) IFNL4 rs368234815, (b) IL28B rs12979860 and (c) IL28B rs8099917. Donors were successfully genotyped in a lower proportion than recipients for rs368234815 and rs8099917. This defines the maximum number of pairs and explains the different total 'n' among the three polymorphisms. Of note, FCH or CH, the most severe forms of recurrence influencing SVR, did not distribute significantly different between the favorable–favorable pairs and the other pair combinations ( $p=0.498$ ). Numbers below bars indicate the number of patients (n). Fav, favorable genotype; Unfav, unfavorable genotype.

Please cite this article in press as: Fernández-Carrillo C, et al. IFNL4 polymorphism predicts response to hepatitis C treatment after liver transplantation. J Clin Virol (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.07.015>



did not find substantial benefit in using IFNL4 instead of IL28B rs12979860 due to their strong linkage disequilibrium (Supplementary Table S2).

In conclusion, we demonstrate that IFNL4 rs368234815 polymorphism is an important predictor of response to peg-IFN plus RBV treatment in the LT setting. Its high level of correlation with routinely used IL28B SNP rs12979860 could mean no advantages in clinical management. Nevertheless, the discovery of IFNL4 stands as a milestone in HCV research and could lead to a profound understanding of HCV-host interactions. As rs368234815 may have cell-specific differential roles, LT could be a unique setting to assess IFNL4 and IL28B since recipient and donor provide complementary perspectives.

#### Funding

X. Forns and M. Navasa received support in part by grants from Instituto de Salud Carlos III (Grant numbers PI11/01907 and PI10/01551, respectively), Ministerio de Economía y Competitividad, co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Una manera de hacer Europa. X. Forns and S. Pérez-del-Pulgar also received a grant from the Roche Organ Transplantation Research Foundation (Grant number 442035057). The other authors were supported by grants from the following institutions: C. Fernández-Carrillo from Asociación Española para el Estudio del Hígado, M. Coto-Llerena from the Roche Organ Transplantation Research Foundation, L. Mensa and N. Caro-Pérez from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad. None of the abovementioned funding sources was involved in study design, the collection, analysis or interpretation of data, neither the writing of this manuscript or the decision to submit it for publication.

#### Competing interests

X. Forns has acted as advisor for Gilead, Jansen and MSD and has received unrestricted grant support from Roche and MSD. M. Navasa has received unrestricted grant support from Novartis. The remaining authors disclose no conflicts.

#### Ethical approval

All patients provided written informed consent and our study was approved by the Ethics Committee of Hospital Clinic of Barcelona, in accordance with the guidelines set forth in the 1975 Declaration of Helsinki.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.07.015>.

#### References

- [1] Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5(9):558–67.
- [2] García-Retortillo M, Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, et al. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002;35(3):680–7.
- [3] Carrion JA, Navasa M, García-Retortillo M, García-Pagan JC, Crespo G, Bruguera M, et al. Efficacy of antiviral therapy on hepatitis C recurrence after liver transplantation: a randomized controlled study. *Gastroenterology* 2007;132(5):1746–56.
- [4] Berenguer M, Palau A, Aguilera V, Rayon JM, Juan FS, Prieto M. Clinical benefits of antiviral therapy in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation. *Am J Transplant* 2008;8(3):679–87.
- [5] Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* 2013;45(2):164–71.
- [6] Bibert S, Roger T, Calandra T, Bochud M, Cerny A, Semmo N, et al. IL28B expression depends on a novel TT/G polymorphism which improves HCV clearance prediction. *J Exp Med* 2013;210(6):1109–16.
- [7] Stattermayer AF, Strassl R, Maieron A, Rutter K, Stauber R, Strasser M, et al. Polymorphisms of interferon-lambda4 and IL28B – effects on treatment response to interferon/ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;39(1):104–11.
- [8] Nozawa Y, Umemura T, Katsuyama Y, Shibata S, Kimura T, Morita S, et al. Genetic polymorphism in IFNL4 and response to pegylated interferon-alpha and ribavirin in Japanese chronic hepatitis C patients. *Tissue Antigens* 2014;83(January (1)):45–8.
- [9] Kramer B, Nischalke HD, Boesecke C, Ingiliz P, Voigt E, Mauss S, et al. Variation in IFNL4 genotype and response to interferon-based therapy of hepatitis C in HIV-positive patients with acute and chronic hepatitis C. *AIDS* 2013;27(17):2817–9.
- [10] Franco S, Aparicio E, Parera M, Clotet B, Tural C, Martinez MA. IFNL4 rs469415590 variant is a better predictor than ILF3 (IL28B) rs12979860 of pegylated interferon-alpha/ribavirin therapy failure in hepatitis C virus/HIV-1 coinfecting patients. *AIDS* 2014;28(1):133–6.
- [11] Fujino H, Imamura M, Nagaoki Y, Kawakami Y, Abe H, Hayes CN, et al. Predictive value of the IFNL4 polymorphism on outcome of telaprevir, peginterferon, and ribavirin therapy for older patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013;(December) [Epub ahead of print].
- [12] Nagaoki Y, Imamura M, Kawakami Y, Kan H, Fujino H, Fukuhara T, et al. IFNL4 polymorphism affects on outcome of telaprevir, peg-interferon and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2014;(April) [Epub ahead of print].
- [13] Meissner EG, Bon D, Prokunina-Olsson L, Tang W, Masur H, O'Brien TR, et al. IFNL4-deltaG genotype is associated with slower viral clearance in hepatitis C, genotype-1 patients treated with sofosbuvir and ribavirin. *J Infect Dis* 2014;209(11):1700–4.
- [14] Coto-Llerena M, Perez-del-Pulgar S, Crespo G, Carrion JA, Martinez SM, Sanchez-Tapias JM, et al. Donor and recipient IL28B polymorphisms in HCV-infected patients undergoing antiviral therapy before and after liver transplantation. *Am J Transplant* 2011;11(5):1051–7.
- [15] Coto-Llerena M, Crespo G, Gonzalez P, Koutsoudakis G, Miquel R, Navasa M, et al. Determination of IL28B polymorphisms in liver biopsies obtained after liver transplantation. *J Hepatol* 2012;56(2):355–8.
- [16] Charlton MR, Thompson A, Veldt BJ, Watt K, Tillmann H, Poterucha JJ, et al. Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2011;53(1):317–24.
- [17] Lange CM, Moradpour D, Doehring A, Lehr HA, Mülhaupt B, Bibert S, et al. Impact of donor and recipient IL28B rs12979860 genotypes on hepatitis C virus liver graft reinfection. *J Hepatol* 2011;55(2):322–7.
- [18] Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, et al. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010;139(5):1577–85.
- [19] Gouw AS, Houthoff HJ, Huitema S, Beelen JM, Gips CH, Poppema S. Expression of major histocompatibility complex antigens and replacement of donor cells by recipient ones in human liver grafts. *Transplantation* 1987;43(2):291–6.
- [20] Hove WR, van Hoek B, Bajema IM, Ringers J, van Krieken JH, Lagaa EL. Extensive chimerism in liver transplants: vascular endothelium, bile duct epithelium, and hepatocytes. *Liver Transplant* 2003;9(6):552–6.
- [21] Kleeberger W, Rothamel T, Glockner S, Flemming P, Lehmann U, Kreipe H. High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis. *Hepatology* 2002;35(1):110–6.
- [22] Hamming OJ, Terczynska-Dyla E, Vieyres G, Dijkman R, Jorgensen SE, Akhtar H, et al. Interferon lambda 4 signals via the IFNLambda receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *EMBO J* 2013;32(23):3055–65.
- [23] McGilvray I, Feld JJ, Chen L, Pattullo V, Guindi M, Fischer S, et al. Hepatic cell-type specific gene expression better predicts HCV treatment outcome than IL28B genotype. *Gastroenterology* 2012;142(5):1122–31.
- [24] Amanzada A, Kopp W, Spengler U, Ramadori G, Mihm S. Interferon-lambda4 (IFNL4) transcript expression in human liver tissue samples. *PLOS ONE* 2013;8(12):e84026.

Please cite this article in press as: Fernández-Carrillo C, et al. IFNL4 polymorphism predicts response to hepatitis C treatment after liver transplantation. *J Clin Virol* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.07.015>

**7.2.1. Material suplementario del artículo del Anexo II**

Association of IFNL4 and IL28B polymorphisms with SVR when donor-recipient pairs carry the favorable genotype

Polymorphism	OR	95% CI	p value
IFNL4 rs368234815	8.627	(2.056-23.198)	0.003
IL28B rs12979860	8.565	(2.023-35.245)	0.003
IL28B rs8099917	4.442	(1.561-12.638)	0.005

OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

7.3. Anexo III: Otros artículos relacionados con la tesis, publicados en el período de doctorado.

**Artículo:**

***“Successful continuation of HCV treatment following liver transplantation.”***

Carlos Fernández Carrillo\*, Gonzalo Crespo, Juan de la Revilla, Maria Buti, José Luis Montero, Emilio Fábrega, Inmaculada Fernández, Cristina Serrano Millán, Victoria Hernández, José Luis Calleja y María Carlota Londoño.

*Transplantation 2016 [Accepted with minor revision]*

Response to Reviewers

Dr Carlos Fernández Carrillo  
Hospital Universitario Puerta de Hierro  
C/ Manuel de Falla, 1  
28222, Majadahonda, Madrid  
SPAIN

12 October 2016

Jeremy R Chapman  
Editor-in-Chief, *Transplantation*

Dear Dr Chapman

**TPA-2016-1142: Successful continuation of HCV treatment following liver transplantation**

We are pleased to detail below our responses to the reviewers' comments on our manuscript:

- **Response to Editor's comment:** We have added a dedicated paragraph on the post-LT treatment duration (page 14, lines 263–268) and specified SOF and ribavirin doses (page 12, lines 206–209).
- **Response to Reviewer 1's comment:** We have included the suggested reference to the last EASL ILC in the discussion (page 13–14, lines 243–248); new reference 14)
- **Response to Reviewer 2's comment:** All requested changes in Table 2 have been made; we have specified the total planned and effective treatment duration, the exact time of HCV RNA determination, and the reasons behind the treatment duration with SOF+PR.

We trust that we have made all the requested changes and that you will consider our manuscript acceptable for publication in *Transplantation*.

Yours sincerely

Carlos Fernández Carrillo

Main - Marked Copy (To Include: Title page, Text, Abstract, References, and Tables.)

1	<b>TITLE PAGE</b>
2	
3	<b>Successful continuation of HCV treatment following liver transplantation</b>
4	
5	
6	<b>3</b>
7	
8	
9	<b>4</b> Carlos Fernández Carrillo, MD <sup>1</sup> , Gonzalo Crespo, MD, PhD <sup>2</sup> , Juan de la Revilla,
10	
11	<b>5</b> MD <sup>1</sup> , Lluís Castells, MD, PhD <sup>3</sup> , Maria Buti, MD, PhD <sup>3</sup> , José Luis Montero, MD, PhD <sup>4</sup> ,
12	
13	<b>6</b> Emilio Fábrega, MD, PhD <sup>5</sup> , Inmaculada Fernández, MD, PhD <sup>6</sup> , Cristina Serrano-
14	
15	<b>7</b> Millán, MPharm <sup>1</sup> , Victoria Hernández, MPharm <sup>1</sup> , José Luis Calleja, MD, PhD <sup>7</sup> ,
16	
17	<b>8</b> María-Carlota Londoño, MD, PhD <sup>2</sup> .
18	
19	
20	
21	<b>9</b>
22	
23	
24	<b>10</b> <sup>1</sup> Liver Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, IDIPHIM,
25	
26	<b>11</b> CIBERehd, Majadahonda, Madrid; <sup>2</sup> Liver Unit, Hospital Clínic de Barcelona,
27	
28	<b>12</b> IDIBAPS, CIBERehd; <sup>3</sup> Liver Unit, Internal Medicine Department, Hospital
29	
30	<b>13</b> Universitario Vall d'Hebron, CIBERehd, Barcelona; <sup>4</sup> Hepatology & Liver Transplant
31	
32	<b>14</b> Unit, Hospital Universitario Reina Sofía, IMIBIC, CIBERehd, Córdoba;
33	
34	<b>15</b> <sup>5</sup> Gastroenterology and Hepatology Unit, Hospital Universitario Marqués de
35	
36	<b>16</b> Valdecilla, IDIVAL, Santander; <sup>6</sup> Digestive Service, Hospital Universitario 12 de
37	
38	<b>17</b> Octubre, Madrid; <sup>7</sup> Liver Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Universidad
39	
40	<b>18</b> Autónoma de Madrid and CIBERehd, Madrid, Spain.
41	
42	
43	
44	
45	
46	
47	<b>19</b>
48	
49	
50	<b>20</b> <b>Corresponding author:</b>
51	
52	
53	<b>21</b> Carlos Fernández Carrillo, MD
54	
55	
56	<b>22</b> Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda
57	
58	
59	<b>23</b> C/ Manuel de Falla, 1
60	
61	
62	
63	
64	
65	

24 28222, Majadahonda, Madrid, Spain

25 Telephone: (+34) 9 11 91 93 34; FAX: (+34) 9 11 91 78 07; E-mail:

26 [cfernandezc@idiphim.org](mailto:cfernandezc@idiphim.org)

27

28 **AUTHORSHIP PAGE**

29 **Author contributions:** Carlos Fernández Carrillo, Cristina Serrano-Millán and  
 30 María-Carlota Londoño contributed to the study concept and design. All authors  
 31 contributed to the acquisition of data. Carlos Fernández Carrillo, Gonzalo Crespo  
 32 and María-Carlota Londoño contributed to the statistical analysis and interpretation  
 33 of data. Carlos Fernández Carrillo provided input into the first draft of the manuscript.  
 34 All authors contributed to the critical revision of the manuscript for important  
 35 intellectual content. All authors approved the final version of the manuscript for  
 36 submission.

37

38 **Disclosures:** María-Carlota Londoño reports personal fees from AbbVie, Bristol-  
 39 Myers Squibb, Gilead, Janssen and Merck Sharp & Dohme; Maria Buti reports grant  
 40 support and / or personal fees from Gilead and Janssen; Inmaculada Fernández  
 41 reports consultancy fees from AbbVie, Bristol-Myers Squibb, Gilead, Janssen and  
 42 Merck Sharp & Dohme; José Luis Calleja reports consultancy and / or speaker fees  
 43 from AbbVie, Bristol-Myers Squibb, Gilead, Janssen and Merck Sharp & Dohme;  
 44 Gonzalo Crespo, Emilio Fábrega, Lluís Castells, Carlos Fernández Carrillo, Cristina  
 45 Serrano-Millán, Juan de la Revilla, José Luis Montero and Victoria Hernández  
 46 declare no conflicts of interest.

47

48 **Funding:**

49 No specific source of funding was used for this work. No grant support was received  
 50 for the conduct of this study. Hepa-C is an initiative of the Spanish Association for  
 51 the Study of the Liver (AEEH) and the Networked Biomedical Research Centre for

52 the Study of the Liver and Digestive Diseases (CIBERehd) funded by unrestricted

53 grants from AbbVie, BMS, Gilead, Janssen and Merck Sharp & Dohme.

54



### 55 ABBREVIATIONS PAGE

56 CTP, Child–Turcotte–Pugh

57 DAA, direct-acting antiviral agent

58 DCV, daclatasvir

59 HCC, hepatocellular carcinoma

60 HCV, hepatitis C virus

61 IFN, interferon

62 LT, liver transplantation

63 LLOQ, lower limit of quantitation

64 MELD, Model for End-stage Liver Disease

65 PEG-IFN, pegylated interferon

66 RBV, ribavirin

67 RNA, ribonucleic acid

68 SAE, serious adverse event

69 SOF, sofosbuvir

70 SVR, sustained virological response

71

**72 ABSTRACT**

**73 Background**

74 Guidelines recommend that patients with hepatitis C virus (HCV)-related liver  
75 disease be treated for HCV before liver transplant (LT) to eliminate the virus prior to  
76 surgery. However, the unpredictability of donor organ availability may limit treatment  
77 duration. Interruption of HCV treatment with resumption post LT is one potential  
78 solution which has not been investigated widely.

**79 Methods**

80 Patients from five clinical centres included in the large, national, non-interventional  
81 Hepa-C registry who started treatment with direct-acting antiviral agents (DAAs)  
82 while awaiting LT were identified retrospectively and followed up prospectively.  
83 Fifteen patients who had treatment interruptions around LT were identified.

**84 Results**

85 The majority of patients (12/15) received interferon-free regimens, most commonly  
86 sofosbuvir+daclatasvir (8/12), for a total of 24 weeks (13/15). Treatment was  
87 discontinued temporarily for a median of 5 (range 2–33) days. Fourteen patients  
88 completing 12 weeks of follow-up achieved a sustained virological response (SVR).  
89 One patient who died prior to Week 12 post treatment achieved a response at post-  
90 treatment Week 4. Treatment was generally well tolerated. Serious adverse events  
91 (SAEs) were recorded in 2/15 patients (anaemia in one patient; pneumonia in one  
92 patient); all arose after LT.

**93 Conclusions**

94 Resumption of DAA therapy after a temporary interruption around LT was highly  
95 effective, achieving SVR in all patients who completed 12 weeks of post-treatment

96 follow-up. Treatment was generally well tolerated pre and post transplantation, with a

97 low rate of SAEs. Such a strategy may offer an important new approach to the

98 treatment of patients awaiting LT which may be assessed in future studies.

99

100 **INTRODUCTION**

101 Liver disease resulting from chronic hepatitis C virus (HCV) infection is the leading  
 102 indication for liver transplant (LT) in Europe, North and South America, Australia, and  
 103 Japan.<sup>1</sup> Infection of the liver graft is universal in patients who undergo LT with  
 104 detectable serum levels of HCV RNA.<sup>1,2</sup> Such infection is associated with rapid  
 105 progression of fibrosis and development of bridging fibrosis–cirrhosis within the first  
 106 five years post transplantation in up to 54% of patients.<sup>3</sup> This can result in graft loss  
 107 and early mortality.<sup>1</sup> Achievement of undetectable HCV RNA in the blood prior to LT  
 108 significantly reduces, although does not fully eliminate, the risk of HCV recurrence  
 109 unless sustained virological response (SVR) is reached.<sup>4</sup> However, until recently,  
 110 this strategy has been challenging because of the poor tolerability and low efficacy of  
 111 interferon (IFN)-based regimens in patients with advanced liver disease.<sup>4</sup> In addition,  
 112 IFN-based therapy is contraindicated in patients with decompensated cirrhosis,<sup>5</sup> who  
 113 account for a significant proportion of those on the transplant waiting list.

114 Recently, treatment with an IFN-free regimen of sofosbuvir plus ribavirin (SOF  
 115 + RBV) was shown to be effective in preventing HCV recurrence post transplantation  
 116 in approximately 70% of patients who achieved undetectable HCV RNA with  
 117 treatment prior to transplantation.<sup>6</sup> Treatment prior to LT, initiated as soon as  
 118 possible in order to complete a full treatment course, is the recommended strategy  
 119 for HCV-infected patients listed for transplantation.<sup>5</sup> However, the period of time  
 120 between listing and transplantation may be unpredictable and some patients may not  
 121 complete the full recommended course of treatment. Consequently, some experts  
 122 have advocated, given that direct-acting antiviral agent (DAA) regimens are effective  
 123 and well tolerated in LT recipients, that postponing treatment and treating recurrent  
 124 HCV infection post transplantation may be a more appropriate strategy.<sup>7–12</sup> However,

125 patient management may be complicated by factors such as postoperative  
 126 complications (infections, bleeding or even requirement of surgical re-intervention),  
 127 kidney impairment related to immunosuppressive drug use, anaemia and acute  
 128 rejection, among others.<sup>13</sup>

129 In a recent analysis of patients with advanced cirrhosis treated with SOF +  
 130 daclatasvir (DCV) + RBV, three patients with hepatocellular carcinoma (HCC)  
 131 achieved SVR after continuation of therapy initiated pre transplantation for 12 weeks  
 132 post transplantation.<sup>9</sup> Although this suggests that this strategy may prevent post-  
 133 transplantation recurrence when prior therapy is insufficient, data are few to support  
 134 this alternative 'bridging' strategy. Therefore we investigated the effectiveness and  
 135 safety of continuing treatment with DAAs in patients included in a large, real-world,  
 136 national registry who underwent LT before completing recommended treatment  
 137 courses of DAA-based therapy.

138

### 139 MATERIALS AND METHODS

140 Hepa-C is a Spanish collaborative, monitored, national registry of HCV-infected  
 141 patients treated in routine clinical practice, led by the Spanish Association for the  
 142 Study of the Liver (AEEH) and the Networked Biomedical Research Centre  
 143 (CIBERehd). Monitoring ensures consistent, accurate data entry and minimises the  
 144 introduction of bias. Patients participating in clinical trials are excluded by default.

145 Fifteen patients from five clinical centres included in the Hepa-C database  
 146 who started treatment with DAAs while awaiting LT between October 8, 2013 and  
 147 January 23, 2015 were retrospectively identified and prospectively followed up.  
 148 Choice of treatment regimen, including selection of DAA, use of RBV and treatment

149 duration were entirely at the clinician's discretion. The study was approved by the  
 150 Research Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda  
 151 (Madrid, Spain).

152

### 153 *Measurements and outcomes*

154 Routine laboratory and clinical information were recorded at baseline, and during  
 155 treatment and follow-up visits according to local practice. Collected data included:  
 156 age; sex; fibrosis stage (determined by transient elastography [FibroScan®] and/or  
 157 liver biopsy); Child–Turcotte–Pugh (CTP) class; Model for End-stage Liver Disease  
 158 (MELD) score; platelet count; HCV RNA level; and HCV genotype. Effectiveness  
 159 outcomes were SVR (negative HCV RNA using a highly sensitive quantitative  
 160 polymerase chain reaction method) at Week 4 (SVR4) and Week 12 (SVR12) post  
 161 treatment. Safety outcomes were serious adverse events (SAEs), defined as any  
 162 life-threatening event, an event that led to hospital admission, prolonged an existing  
 163 hospital stay or resulted in death, or those that were considered serious based on  
 164 the judgement of the treating physician, and deaths during the treatment and follow-  
 165 up period. Descriptive statistics were used to summarise the data (number, median,  
 166 minimum, maximum for quantitative variables, and relative frequencies for  
 167 categorical variables).

168

## 169 **Results**

### 170 *Patient characteristics*

171 The majority of patients (11/15) were male (**Table 1**). Median age of the total cohort  
 172 was 61 (range 48–69) years. All but one patient had genotype 1 infection,

predominantly subgenotype 1b. Based on baseline characteristics, the overall cohort could be divided into two groups: those with more advanced liver disease (CTP B or C and median MELD score = 18 [range 13–27]), n=7 (47%), and those with less advanced liver disease (CTP A and median MELD score 8 [range 7–13]), n=8 (53%). Of the eight patients in the less advanced disease group, seven had been prioritised for LT due to HCC. Median age was similar in both subgroups (CTP A, 58 years; CTP B/C, 61 years).

#### *Treatment*

The majority of patients (12/15) were treated with IFN-free regimens, most commonly SOF + DCV (8/12) (**Table 2**). Liver transplant was performed after a median of 4 (range 1–16) weeks of treatment. Twelve patients were HCV RNA negative at time of transplantation (**Table 2**). Three patients were transplanted with detectable HCV RNA. One patient (patient 14) had an HCV RNA level of 155 IU/mL at 1 week post LT, but subsequently became HCV RNA undetectable, in one patient HCV RNA was undetectable post LT (patient 6) and in the third patient no early post-LT HCV RNA kinetics data were available (patient 7). Treatment was discontinued temporarily for a median of 5 (2–33) days. Five patients discontinued treatment for  $\geq 2$  weeks due to complications during the immediate and early post-transplant period: patient 1 due to acute kidney injury requiring dialysis and acute rejection; patient 2 due to severe acute rejection with severe acute liver failure requiring a corticosteroid bolus; patient 3 due to haemoperitoneum; patient 5 due to severe acute rejection requiring a corticosteroid bolus; and patient 11 due to hospital-acquired pneumonia with re-intubation and difficult weaning. No patient with

197 undetectable HCV RNA at the time of LT became HCV RNA positive during

198 treatment interruption.

199

200 *Outcomes*

201 All patients achieved SVR4. One patient died prior to a Week 12 post-treatment

202 assessment. All 14 patients who completed 12 weeks of follow-up achieved SVR12.

203 Treatment was generally well tolerated. To improve tolerability of the

204 treatment regimen, RBV was discontinued in patient 11, who was initially treated with

205 SOF + DCV + RBV, and pegylated-IFN (PEG-IFN) was discontinued in all three

206 patients who initiated treatment with SOF + PEG-IFN + RBV. Since all patients had

207 an estimated glomerular filtration rate > 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, SOF was reintroduced

208 at the standard dose of 400 mg per day. RBV was resumed at reduced doses (800

209 or 600 mg per day) in patients 1 – 3 and 14.

210 SAEs were recorded in 2/15 patients (13%); one (patient 1) experienced

211 anaemia requiring erythropoietin and blood transfusion, and one (patient 11)

212 experienced grade 4 infection (pneumonia requiring re-intubation). One patient died

213 between Week 4 and Week 12 post treatment due to hospital-acquired pneumonia.

214 Death was not considered to be related to DAA treatment. All SAEs occurred post

215 LT.

216

217 **Discussion**

218 In our case series, resumption of DAA therapy after temporarily interrupting

219 treatment for up to 33 days around LT was highly effective, achieving SVR12 in all

220 patients who completed 12 weeks of post-treatment follow-up. Treatment was



221 generally well tolerated pre and post transplantation, with a low rate of SAEs being  
 222 reported.

223 Although there has been some debate around whether to treat patients pre or  
 224 post LT, current guidelines recommend that treatment for HCV with IFN-free DAA  
 225 regimens be initiated as soon as possible once patients are listed.<sup>5</sup> Such a treatment  
 226 strategy has the dual goal of preventing liver graft infection, and improving liver  
 227 function prior to transplantation, potentially leading to delisting of some patients.<sup>5</sup>  
 228 However, one problem with this strategy is the unpredictability of the time from listing  
 229 to availability of a donor organ,<sup>5,13</sup> which, if limited, may result in a suboptimal  
 230 treatment duration prior to transplantation. In a phase 2 study of patients with HCV-  
 231 related HCC and compensated or mildly decompensated cirrhosis treated with SOF  
 232 + RBV until time of LT (range 2.3–52.3 weeks), the number of consecutive days prior  
 233 to transplantation that the patient's HCV RNA levels were below the lower limit of  
 234 quantification (LLOQ) was the only predictor of post-transplant virological response  
 235 (defined as HCV RNA level < LLOQ at 12 weeks post transplantation in patients who  
 236 had HCV RNA levels < LLOQ at their last assessment before transplantation).<sup>6</sup> In  
 237 this study, patients with HCV recurrence (23%) had a median of 5.5 (range 0–88)  
 238 days of undetectable HCV RNA, compared with 99.5 (range 1–473) days in the 70%  
 239 of patients with a post-transplant virological response. A threshold of 30 days with  
 240 undetectable HCV RNA pre LT was suggested to prevent post-LT recurrence.<sup>6</sup>  
 241 Nevertheless, it is unknown whether this threshold is also valid for regimens  
 242 including two DAAs. A recent evaluation of pooled data from the SOLAR-1 and  
 243 SOLAR-2 studies found that among 17 transplant patients, seven of whom received  
 244 transplants prior to completing treatment with ledipasvir (LDV)/SOF + RBV, 16 were  
 245 HCV RNA negative 12 weeks after LT.<sup>14</sup> These 16 patients had all received at least

11 weeks of LDV/SOF + RBV prior to LT and based on these data the authors suggested that an 11-week treatment course prior to LT might be sufficient to prevent HCV recurrence. However, data remain very limited and more studies are required.

In our cohort of patients, pre-LT treatment duration, and even very short periods of treatment (1–4 weeks), had no impact on achievement of SVR12 once treatment was recommenced. In addition, no patient with undetectable HCV RNA at the time of treatment interruption subsequently experienced HCV RNA positivity, irrespective of the period of discontinuation (2–33 days). This may be explained in part by the sudden decrease in viral load inherent to transplantation that may contribute to keeping serum HCV RNA levels under control despite the absence of circulating DAAs after initial treatment and despite, in some cases, detectable intrahepatic HCV RNA.<sup>15,16</sup> Based on these observations the need to resume treatment in all patients could be questioned. However, the real-world nature of this study precluded rigorous evaluation of viral kinetics and a period of HCV RNA positivity prior to resumption of treatment cannot be entirely ruled out. In addition, a relapse-saving period of undetectable serum HCV RNA prior to LT, that is valid for any DAA regimen, is still to be clearly defined.

Most of our patients were treated for at least 12 weeks after LT. We acknowledge that this could have influenced the outcome of our treatment strategy, irrespective of the pre-LT treatment course. However, to address this requires a prospective study design and is beyond the power of our study. Furthermore, the characteristics of this population render its management unpredictable since patients with advanced liver disease may be enlisted during treatment.

Our results are consistent with a case report of a patient with decompensated cirrhosis following severe recurrent HCV infection who achieved SVR following peri-transplantation treatment with SOF + RBV for a total of 24 weeks.<sup>17</sup> In addition, in the ALLY-1 study, three patients, all with HCC, underwent LT during treatment with SOF + DCV + RBV and subsequently received treatment extension for 12 weeks post transplantation according to the study protocol.<sup>9</sup> All three patients achieved SVR12, including one patient who received a liver from a genotype 1a-infected donor. These data together with the observations from our case series suggest that 'bridging' transplantation with DAA-based regimens has the potential to achieve SVR and prevent post-transplantation HCV recurrence with an acceptable safety profile when a full treatment course is not completed prior to transplantation. Such a strategy may offer an important new approach to treatment of patients awaiting LT. Further studies are needed in larger patient cohorts to confirm these findings and to establish optimal regimens and clear recommendations in this special population.

284

#### 285 Acknowledgements

286 The authors thank the patients for their consent to participate in the Hepa-C registry.  
287 Medical writing assistance was provided by Connect2 CME Ltd, Tunbridge Wells,  
288 Kent, UK and was funded by the Spanish Association for the Study of the Liver.

289

## 290 REFERENCES

- 291 1. Crespo G, Mariño Z, Navasa M, Forns X. Viral hepatitis in liver transplantation.  
292 *Gastroenterology*. 2012;142:1373–1383.
- 293 2. Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A, et al. Hepatitis C virus kinetics during and  
294 immediately after liver transplantation. *Hepatology*. 2002;35:680–687.
- 295 3. Berenguer M, Schuppan D. Progression of liver fibrosis in post-transplant  
296 hepatitis C: mechanisms, assessment and treatment. *J Hepatol*.  
297 2013;58:1028–1041.
- 298 4. Price JC, Terrault NA. Treatment of hepatitis C in liver transplant patients:  
299 interferon out, direct antiviral combos In. *Liver Transpl*. 2015;21:423–434.
- 300 5. European Association for Study of Liver. EASL Recommendations on treatment  
301 of hepatitis C 2015. *J Hepatol*. 2015;63:199–236.
- 302 6. Curry MP, Forns X, Chung RT, et al. Sofosbuvir and ribavirin prevent recurrence  
303 of HCV infection after liver transplantation: an open-label study.  
304 *Gastroenterology*. 2015;148:100–107.
- 305 7. Forns X, Charlton M, Denning J, et al. Sofosbuvir compassionate use program for  
306 patients with severe recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology*.  
307 2015;61:1485–1494.
- 308 8. Charlton M, Gane E, Manns MP, et al. Sofosbuvir and ribavirin for treatment of  
309 compensated recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation.  
310 *Gastroenterology*. 2015;148:108–117.
- 311 9. Poordad F, Schiff ER, Vierling JM, et al. Daclatasvir with sofosbuvir and ribavirin  
312 for hepatitis C virus infection with advanced cirrhosis or post-liver transplantation  
313 recurrence. *Hepatology*. 2016;63:1493–1505.

10. Saab S, Greenberg A, Li E, et al. Sofosbuvir and simeprevir is effective for recurrent hepatitis C in liver transplant recipients. *Liver Int.* 2015;35:2442–2447.
11. Pungpapong S, Aql B, Leise M, et al. Multicenter experience using simeprevir and sofosbuvir with or without ribavirin to treat hepatitis C genotype 1 after liver transplant. *Hepatology.* 2015;61:1880–1886.
12. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Treat chronic hepatitis C virus infection in decompensated cirrhosis - pre- or post-liver transplantation? The ironic conundrum in the era of effective and well-tolerated therapy. *J Viral Hepatol.* 2016;23:408–418.
13. Aghemo A, Donato MF. Sofosbuvir treatment in the pre and post liver transplantation phase: the sooner, the better. *Gastroenterology* 2015;148:13–16.
14. Mullhaupt B, Kwo P, Agarwal K, et al. High Efficacy of ledipasvir/sofosbuvir plus ribavirin among patients with decompensated cirrhosis who underwent liver transplant during participation in the SOLAR-1 and-2 studies. *J Hepatology* 2016;64:S749.
15. Gambato M, Pérez-Del-Pulgar S, Hedskog C, et al. HCV RNA persists in liver explants of most patients awaiting liver transplantation treated with an interferon-free regimen. *Gastroenterology.* 2016 doi: 10.1053/j.gastro.2016.06.025. [Epub ahead of print].
16. Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A, et al. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology.* 2002;35:680–687.
17. Donato MF, Monico S, Malinverno F, et al. Bridging all oral DAA therapy from wait time to post-liver transplant to improve HCV eradication? *Liver Int.* 2015;35:1–4.

## 339 Tables

340 Table 1. Baseline characteristics

Pt	Sex	Age (years)	Fibrosis stage*	CTP	MELD score	Platelets (x10 <sup>9</sup> /L)	HCC	Genotype
1	M	62	F4	A	11	172	Yes	1b
2	M	49	F4	A5	7	140	Yes	1b
3	M	55	F4	A5	7	108	Yes	1a
4	M	61	F4	A5	7	147	Yes	1b
5	M	48	F4	A5	7	69	Yes	1b
6	F	69	F4	A5	8	76	Yes	1
7	M	54	F4	A6	13	52	No	1b
8	F	69	F4	A6	10	50	Yes	1
9	M	52	F4	B	13	80	Yes	1a
10	M	61	F4	B8	17	72	Yes	1a
11	M	61	F4	B8	13	75	Yes	1b
12	M	48	F4	B8	27	75	No	4
13	M	64	F4	B9	17	47	No	1b

1	14	F	48	F4	C10	ND	155	No	1a
2									
3									
4	15	F	63	F4	C10	19	83	No	1b
5									
6									
7	341								
8									
9									
10	342	*Elastographic and/or histological criteria							
11									
12									
13	343	CTP, Child-Turcotte-Pugh; HCC, hepatocellular carcinoma; MELD, Model for End-							
14									
15									
16	344	stage Liver Disease; ND, no data; Pt, patient							
17									
18									
19	345								
20									
21									
22	346								
23									
24									
25	347								
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									
45									
46									
47									
48									
49									
50									
51									
52									
53									
54									
55									
56									
57									
58									
59									
60									
61									
62									
63									
64									
65									

348 Table 2. Treatment regimens

Pt	DAA regimen	Intended treatment duration (weeks)	Time to LT (weeks)	Total treatment duration <sup>†</sup> (weeks)	Treatment interruption (days)	HCV RNA at LT <sup>†</sup> (IU/mL)
1	PR + SOF*	12	1	24	21	Undet
2	PR + SOF*	12	5	15	33	Undet
3	PR + SOF*	12	2	24	14	Undet
4	SOF + SMV	12	2	12	4	Undet
5	SOF + DCV	24	4	24	14	Undet
6	SOF + DCV	24	4	24	5	<15
7	SOF + DCV	24	4	24	4	69
8	SOF + DCV	24	4	24	3	Undet
9	SOF + DCV	24	16	24	3	Undet
10	SOF + DCV	24	15	24	3	Undet
11	SOF + DCV + RBV	24	10	24	17	Undet
12	SMV + DCV	24	8	24	3	Undet



1	13	SOF + DCV	24	16	24	5	Undet
2							
3	14	SOF + RBV	24–48	4	24	3	<15
4							
5	15	SOF + DCV	24	1	24	2	Undet
6							
7							
8							
9							
10							
11	349						
12							
13							
14	350	*Based on individual patient characteristics, this regimen was converted to					
15							
16	351	interferon-free after liver transplantation to improve tolerability. As a result, total					
17							
18	352	treatment duration was extended and differed from current guidelines.					
19							
20							
21	353	†Excluding period of interruption.					
22							
23							
24	354	†Last HCV RNA determination before liver transplantation.					
25							
26							
27							
28	355	DCV, daclatasvir; LT, liver transplantation; PR, pegylated interferon + ribavirin; Pt,					
29							
30	356	patient; RBV, ribavirin; SMV, simeprevir; SOF, sofosbuvir; Undet, undetectable.					
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							
50							
51							
52							
53							
54							
55							
56							
57							
58							
59							
60							
61							
62							
63							
64							
65							

**Artículo:**

***“Reactivation of Herpesvirus in Patients With Hepatitis C Treated With Direct-Acting Antiviral Agents.”***

Christie Perelló, Carlos Fernández Carrillo\*, María Carlota Londoño, Teresa Arias Loste, Marta Hernández Conde, Susana Llerena, Javier Crespo, Xavier Forns y José Luis Calleja.

*Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2016 May 20. [Epub ahead of print]*

## Reactivation of Herpesvirus in Patients With Hepatitis C Treated With Direct-Acting Antiviral Agents

Christie Perelló M.,<sup>\*</sup> Carlos Fernández-Carillo,<sup>\*</sup> María-Carlota Londoño,<sup>‡</sup> Teresa Arias-Loste,<sup>§</sup> Marta Hernández-Conde,<sup>\*</sup> Susana Llerena,<sup>§</sup> Javier Crespo,<sup>§</sup> Xavier Forns,<sup>‡</sup> and José Luis Calleja<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Liver Unit, Puerta de Hierro University Hospital, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Majadahonda, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Majadahonda, Madrid, Spain; <sup>‡</sup>Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain; <sup>§</sup>Digestive Service, Marqués de Valdecilla University Hospital, Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla, Santander, Spain

We performed a case-series analysis of reactivation of herpesvirus in patients with hepatitis C virus (HCV) infection treated with direct-acting antiviral (DAA) agents. We collected data from 576 patients with HCV infection treated with DAA combinations at 3 hospitals in Spain, from November 2014 through November 2015. We also collected data from a control population (230 HCV-infected patients, matched for sex and age; 23 untreated and 213 treated with interferon-based regimens). Herpesvirus was reactivated in 10 patients who received DAA therapy (7 patients had cirrhosis and 3 patients had received liver transplants), a median of 8 weeks after the therapy was initiated. None of the controls had herpesvirus reactivation. Patients with herpesvirus reactivation were receiving the DAA agents sofosbuvir with ledipasvir (with or without ribavirin, 7/10), ombitasvir with paritaprevir and ritonavir plus dasabuvir (with or without ribavirin, 2/10), or sofosbuvir with simeprevir plus ribavirin (1/10). Two of the 10 patients developed postherpetic neuralgia and 1 patient developed kerato-uveitis. All 10 patients with herpesvirus reactivation achieved a sustained virologic response. Immune changes that follow clearance of HCV might lead to reactivation of other viruses, such as herpesvirus. Patients with HCV infection suspected of having herpesvirus infection should be treated immediately. Some groups also might be screened for herpesvirus infection.

**Keywords:** Varicella-Zoster Virus; Viral Reactivation; Hepatitis C Virus; Antiviral Immune Response.

Treatment of hepatitis C virus (HCV) infection has undergone a dramatic change with the new direct-acting antivirals (DAAs), by decreasing treatment duration and side effects associated with prior pegylated-interferon (PEG-IFN)-based treatments.<sup>1,2</sup> In the current interferon-free era, the increased incidence of bacterial infections seems to have been overcome. However, we observed several cases of herpesvirus (HV) reactivation during or shortly after treatment with different combinations of DAAs.

### Methods

A review was performed of 576 patients with chronic HCV infection treated with DAAs between November 2014 and November 2015 in 3 Spanish university hospitals. A historic control cohort of 236 sex- and age-matched HCV-infected patients was used, with a median follow-up period of 37 months. This control cohort encompassed 23 untreated patients (10%) and 213 patients (90%) treated with IFN-based regimens, including PEG-IFN + ribavirin (RBV) and triple therapy using first-wave protease inhibitors. The cohort included 10 patients (4%) with liver transplantation (LT) (1 untreated, 9 treated).

### Results

We identified 10 of 576 cases (2%) of HV reactivation during treatment in 2 populations: non-immunocompromised and medically immunocompromised patients (LT) (Table 1). The clinical presentations were as follows: 7 of 10 cutaneous, 2 of 10 ocular, and 1 of 10 labialis. The median age was 67 years. Most patients had advanced liver fibrosis and 3 of the patient had undergone LT. HV reactivation was diagnosed at a median of 8 weeks after therapy initiation. Complications included postherpetic neuralgia (PHN) (2 of 10 patients), and herpetic kerato-uveitis (1 of 10 patients). The HCV regimens were as follows: sofosbuvir/ledipasvir ± RBV (7 of 10 patients), ombitasvir/paritaprevir/ritonavir + dasabuvir ± RBV (2 of 10 patients), and sofosbuvir/simeprevir + RBV (1 of 10 patients).

**Abbreviations used in this paper:** DAA, direct-acting antivirals; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; HV, herpesvirus; HZ, herpes zoster; IRIS, immune reconstitution inflammatory syndrome; LT, liver transplantation; PEG-IFN, pegylated-interferon; PHN, postherpetic neuralgia; RBV, ribavirin; SVR, sustained virologic response; VZV, varicella-zoster virus.

© 2016 by the AGA Institute  
1542-3565/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2016.05.016>

Descargado de ClinicalKey.es desde HOSPITAL PUERTA DE HIERRO septiembre 24, 2016.  
Para uso personal exclusivamente. No se permiten otros usos sin autorización. Copyright ©2016. Elsevier Inc. Todos los derechos reservados.

Table 1. Baseline Characteristics of the Patients

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case 10
Age, y	68	75	57	59	70	73	79	58	71	67
Sex	Male	Female	Male	Female	Female	Female	Male	Male	Female	Female
Diabetes mellitus	No	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
Liver stiffness, kPa	22.00	13.60	11.00	27.00	8.30	14.80	21.00	NA	17.30	17.50
Genotype	1b	1b	4	1a	1b	1b	1b	1a	1b	1b
Previous treatment	Peg-IFN + RBV	Peg-IFN + RBV	Naive	Peg-IFN + RBV	Peg-IFN + RBV	IFN + RBV	Naive	Peg-IFN + SIM + RBV	Naive	Peg-IFN + TVR + RBV
CPT score	A5	A5	—	—	—	A5	A5	A5	A5	A5
Liver transplantation	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	On list
Tacrolimus	No	Yes	No	—	—	—	—	—	—	—
Cyclosporin	Yes	No	Yes	—	—	—	—	—	—	—
Mycophenolate mofetil	Yes	No	No	—	—	—	—	—	—	—
Steroids	No	No	Yes	—	—	—	—	—	—	—
Previous CMV infection	Yes	Yes	Yes	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Yes
Treatment week	20	10	8	6	10	22	8	4	4	4
Type of VZV reactivation	Cutaneous	Cutaneous	Cutaneous	Ocular	Labialis	Cutaneous	Cutaneous	Cutaneous	Cutaneous	Ocular

CPT, Child-Pugh-Turcotte; CMV, cytomegalovirus; NA, not available.  
<sup>a</sup>Child-Pugh score was not valid as a result of anticoagulant treatment.

### Case 1

The first case was a 68-year-old man who was treatment experienced and who underwent LT in 2009 owing to decompensated cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). He was treated with sofosbuvir/ledipasvir + RBV (1200 mg/24 h) for 24 weeks. At week 20 he developed monometameric dorsal herpes zoster with severe pain (Figure 1), which was treated with famciclovir (500 mg/8 h) for 7 days and analgesics. The patient developed PHN and needed ablation for pain control. Currently, he still has residual symptoms and has achieved sustained virologic response (SVR).

### Case 2

The second case was a 75-year-old woman with HVC-related cirrhosis and treatment experience. She underwent a LT in 2009 owing to cirrhosis and HCC. She received sofosbuvir/ledipasvir + RBV (1000 mg/24 h) during 24 weeks. At week 10, she presented with monometameric right hemithorax herpes zoster and she was treated with famciclovir 500 mg/8 h and analgesics. The patient developed PHN and received gabapentin as treatment, recovering without sequelae, and also achieving SVR.

### Case 3

The third case was a 57-year-old man who underwent a LT in 2013 owing to HCV-related cirrhosis and HCC. After HCV recurrence and a cryoglobulinemic vasculitis, he started treatment with sofosbuvir/ledipasvir + RBV (800 mg/24 h). At week 8, he developed a monometameric herpes zoster treated with valacyclovir 1 g/8 h. Complete resolution was achieved. The patient completed 12 weeks post-HCV treatment with an undetectable RNA (SVR).

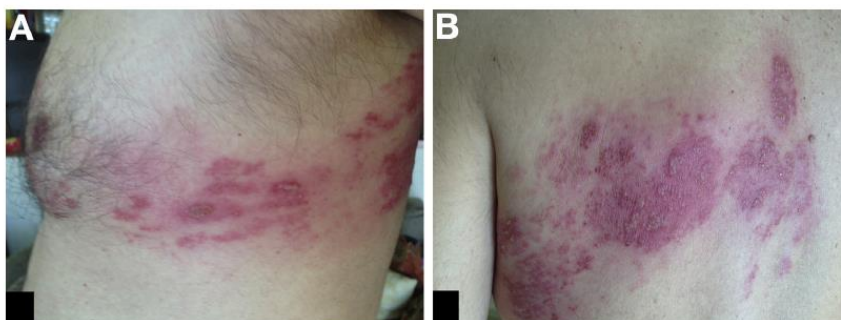
### Case 4

The fourth case was a 59-year-old woman, HCV-treatment experienced with decompensated cirrhosis (medically controlled ascites), treated with sofosbuvir + simeprevir + RBV (1000 mg/24 h) during 12 weeks. At week 6, the patient was diagnosed with ocular herpes. She received oral acyclovir (800 mg/4 h) for 7 days without sequelae and completed HCV treatment, achieving SVR.

### Case 5

The fifth case was a 70-year-old woman with chronic hepatitis C, and previous early discontinuation of PEG-IFN + RBV. She received treatment with ombitasvir/paritaprevir/ritonavir + dasabuvir during 12 weeks. At week 10, she developed severe herpes labialis, which completely





**Figure 1.** Severe herpes zoster in a liver transplant patient. (A) Lateral view and (B) dorsal view of patient 1, who developed herpes zoster along one left thoracic metamere at treatment week 20. Dermatologic manifestations were accompanied by severe pain, which turned into postherpetic neuralgia requiring neural ablation. Although sustained virologic response was achieved, residual symptoms still remain.

resolved after oral acyclovir (800 mg/4 h) for 7 days. The patient completed HCV treatment, achieving SVR.

#### Case 6

The sixth case was a 73-year-old woman with compensated HCV-related cirrhosis who was a previous nonresponder. She began treatment with sofosbuvir/ledipasvir during 24 weeks. At week 22 she presented with bilateral monometameric herpes zoster and was treated with famciclovir 500 mg/8 h for 7 days with no complications. Finally, the patient achieved SVR.

#### Case 7

The seventh case was a 79-year-old man with compensated HCV-related cirrhosis who was treatment-naïve. He was treated with sofosbuvir/ledipasvir during 12 weeks. After 8 weeks of treatment he developed herpes zoster that was treated with valacyclovir 1 g/8 h for 7 days. HCV treatment was completed, and he achieved SVR.

#### Case 8

The eighth case was a 58-year-old man who was a previous nonresponder, and was treated with sofosbuvir/ledipasvir + RBV (1000 mg/24 h) during 24 weeks. At week 4, he developed herpes zoster treated with acyclovir (800 mg/4 h) for 7 days. He later developed a PHN that required treatment with pregabalin. The patient currently has an SVR.

#### Case 9

The ninth case was a 71-year-old woman with compensated HCV-related cirrhosis (esophageal varices on primary prophylaxis with propranolol), and who was treatment-naïve. She began treatment with ombitasvir/paritaprevir/ritonavir + dasabuvir + RBV (1000 mg/d).

At week 4 she was diagnosed with periorbital herpes and was started on acyclovir 800 mg/4 h during 7 days, with complete resolution of symptoms. Currently, the patient has undetectable HCV RNA at week 12 post-treatment, thus, SVR.

#### Case 10

The 10th case was a 67-year-old woman who was treatment experienced and is awaiting liver transplantation for HCV-related cirrhosis and HCC. The patient started treatment with sofosbuvir/ledipasvir + RBV (600 mg/d). At week 4, she was diagnosed with severe ophthalmic herpes with associated kerato-uveitis and was treated with valacyclovir 1 g/8 h during 7 days. Currently, the patient has achieved SVR.

### Discussion

In the interferon era, bacterial infections were relatively common in patients receiving treatment for HCV, especially when advanced liver disease was present.<sup>1,2</sup> With new interferon-free regimens, infectious complications do not appear to be a problem in this setting.

The herpesvirus family is known for its ability to establish life-long infection.<sup>3</sup> Most adults are infected with herpes virus-1, varicella-zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus, and probably herpes virus-6 and herpes virus-7.<sup>4</sup>

Herpes zoster (HZ) is the result of reactivation of a previous VZV infection, remaining latent in cranial nerves and dorsal root ganglia and manifesting in periods when there is a direct or indirect down-regulation of the immune system.<sup>3,5,6</sup> However, balance between latency and reactivation of VZV seems to be a complex process in which a precise understanding of the activated pathways by clinical factors is lacking.<sup>3</sup>

Several studies have shown that VZV reactivation, most commonly as cutaneous herpes zoster, can be observed in transplanted patients receiving immunosuppressive

treatment. Those patients receiving a more intensive immunosuppression (typically heart or lung recipients) are at higher risk, particularly with age older than 60 years.<sup>5-7</sup> Cases 1, 2, and 3 were LT patients, and 2 of these patients were older than age 65, and therefore they would share some of the earlier-mentioned risk factors (Table 1). Nevertheless, all of the reactivations that occurred in our patients happened during HCV treatment.

Regarding the other 7 immunocompetent patients, a diminished lymphocyte count and advanced age in cases 4, 5, and 9 could be considered as predisposing conditions (Table 1 and Supplementary Table 1). We could not find any other typical risk factor for HV reactivation, such as psychological or physical stress, concurrent infection, or significant anemia. Disregarding immune impairment previously described in cirrhotic patients, specific immune disturbances also have been described in chronic infection with HCV. However, treatment with DAAs theoretically would restore these disturbances related to an exhausted immune system, especially regarding cellular immunity.<sup>8-10</sup> Thus, the mechanism of these reactivations could even seem paradoxical.

Two different arguments could be advocated to enlighten our findings. First, 3 cases of hepatitis B virus (HBV) reactivation have been reported recently in patients treated with simeprevir and sofosbuvir.<sup>11,12</sup> The authors of the case reports on HBV reactivation proposed that viral interference on HBV replication caused by HCV would be disrupted by treatment with DAAs. Therefore, HBV would experience a reactivation after HCV clearance, boosted by PEG-IFN absence. These reports justified a recent review statement on HBV reactivation by the European Medicines Agency.<sup>13</sup> Second, it is tempting to trace some parallelisms with immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS), which can be seen in some human immunodeficiency virus-infected patients after highly active antiretroviral therapy. This syndrome implies a pathologic inflammatory response to previously acquired conditions in the setting of an improved immune response, mucocutaneous HZ being one of them.<sup>14</sup> IRIS can happen even several months after initiation of highly active antiretroviral therapy. Similarly, we observed 2 extra cases of HZ reactivation at 1 and 3 weeks after the end of treatment (data not shown). Bearing in mind the earlier-mentioned immune implications of HCV chronic infection and treatment with DAA, it is interesting that cellular immunity has been related specifically to VZV reactivation in patients with IRIS.<sup>8,15</sup> On the other hand, immune changes after quick HCV clearance may be complex, including a down-regulation of interferon-stimulated genes, which are key elements of antiviral defense.<sup>16</sup> In addition, an important report was published very recently on the possible risk of hepatocellular carcinoma reactivation after DAA treatment.<sup>17</sup> One of the explanations could be a decrease in immune surveillance as a result of a sudden and early viral clearance in the context of IFN-free regimens. In sum, treatment with a DAA alone might lead to a

transitory change of immune status, which would favor HV reactivation in some patients.

The incidence of HV reactivation was low in our cohort (1.74% per person-year; 95% confidence interval, 0.84%–3.17%). Nevertheless, we compared this series with a control cohort of HCV-infected patients either untreated or treated with IFN-based regimens, and no patient from this cohort showed HV reactivation.

Even when a causal relationship is not definitive, based on the temporal association and recent experience we conclude that the incidence of HV reactivation may be increased among patients on IFN-free regimens. Therefore, we advise a high grade of clinical suspicion to prescribe early treatment. HV status also may be checked when other risk factors are present (LT or advanced age) and VZV vaccine may be useful for non-LT patients before HCV treatment.<sup>18</sup> More research is necessary in this new field because unexpected events might be arising in patients treated with DAA.

## Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Clinical Gastroenterology and Hepatology* at [www.cghjournal.org](http://www.cghjournal.org), and at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2016.05.016>.

## References

1. Londono MC, Perello C, Cabezas J, et al. The addition of a protease inhibitor increases the risk of infections in patients with hepatitis C-related cirrhosis. *J Hepatol* 2015;62:311–316.
2. Carrion JA, Martinez-Bauer E, Crespo G, et al. Antiviral therapy increases the risk of bacterial infections in HCV-infected cirrhotic patients awaiting liver transplantation: a retrospective study. *J Hepatol* 2009;50:719–728.
3. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation—viral strategies and host response. *J Oral Microbiol* 2013;5:22766.
4. Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F, et al. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 1981;16:201–217.
5. Humar A, Washburn K, Freeman R, et al. An assessment of interactions between hepatitis C virus and herpesvirus reactivation in liver transplant recipients using molecular surveillance. *Liver Transpl* 2007;13:1422–1427.
6. Pavlopoulou ID, Pouloupoulou S, Melexopoulou C, et al. Incidence and risk factors of herpes zoster among adult renal transplant recipients receiving universal antiviral prophylaxis. *BMC Infect Dis* 2015;15:285.
7. Kimball P, Verbeke S, Shiffman M. HCV core protein augments cyclosporine immunosuppression. *Transplant Proc* 2005;37:652–653.
8. Martin B, Hennecke N, Lohmann V, et al. Restoration of HCV-specific CD8+ T cell function by interferon-free therapy. *J Hepatol* 2014;61:538–543.
9. Hartling HJ, Gaardbo JC, Ronit A, et al. Impaired thymic output in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Scand J Immunol* 2013;78:378–386.
10. Serti E, Chepa-Lotrea X, Kim YJ, et al. Successful interferon-free therapy of chronic hepatitis C virus infection normalizes natural killer cell function. *Gastroenterology* 2015;149:190–200 e192.



11. Ende AR, Kim NH, Yeh MM, et al. Fulminant hepatitis B reactivation leading to liver transplantation in a patient with chronic hepatitis C treated with simeprevir and sofosbuvir: a case report. *J Med Case Rep* 2015;9:164.
12. Collins JM, Raphael KL, Terry C, et al. Hepatitis B virus reactivation during successful treatment of hepatitis C virus with sofosbuvir and simeprevir. *Clin Infect Dis* 2015;61:1304–1306.
13. European Medicines Agency (EMA). EMA reviews direct-acting antivirals for hepatitis C review to investigate possible hepatitis B re-activation. London: European Medicines Agency (EMA), 2016;EMA/199242/2016.
14. Tsang CS, Samaranayake LP. Immune reconstitution inflammatory syndrome after highly active antiretroviral therapy: a review. *Oral Dis* 2010;16:248–256.
15. Daar ES. Potent antiretroviral therapy does more than just decrease viral load. *Clin Infect Dis* 1998;27:1514–1516.
16. Meissner EG, Wu D, Osinusi A, et al. Endogenous intrahepatic IFNs and association with IFN-free HCV treatment outcome. *J Clin Invest* 2014;124:3352–3363.
17. Reig M, Marino Z, Perello C, et al. Unexpected early tumor recurrence in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma undergoing interferon-free therapy: a note of caution. *J Hepatol* 2016. Epub ahead of print.
18. Hales CM, Harpaz R, Ortega-Sanchez I, et al. Update on recommendations for use of herpes zoster vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014;63:729–731.

**Reprint requests**

Address requests for reprints to: José Luis Calleja, MD, Liver Unit, Puerta de Hierro University Hospital, Manuel de Falla 1, 28222-Majadahonda, Madrid, Spain. e-mail: [joseluis.calleja@uam.es](mailto:joseluis.calleja@uam.es); fax: 34 911917807.

**Conflicts of interest**

These authors disclose the following: María-Carlota Londoño is an advisor for Gilead, BMS, and Janssen, and also has received lecture fees from Gilead, MSD, Janssen, BMS, and AbbVie; Xavier Forns is an advisor for AbbVie, Gilead, and Janssen, and also has received grant support from Janssen and AbbVie; and Javier Crespo and José Luis Calleja are advisors for Gilead, MSD, Janssen, and AbbVie, and also have received lecture fees from Gilead, BMS, MSD, and Janssen. The remaining authors disclose no conflicts.

**Artículo:**

***“Viral hepatitis and liver transplantation: pathogenesis, prevention and therapy of recurrent disease.”***

Martina Gambato, Sabela Lens, Carlos Fernández Carrillo, Ignacio Alfaro y Xavier Forn.

*Digestive Diseases. 2014;32(5):538-44.*



# Viral Hepatitis and Liver Transplantation: Pathogenesis, Prevention and Therapy of Recurrent Disease

Martina Gambato · Sabela Lens · Carlos Fernández-Carrillo · Ignacio Alfaro  
Xavier Forns

Liver Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS and CIBEREHD, Barcelona, Spain

© S. Karger AG, Basel

**PROOF Copy  
for personal  
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS  
ARTICLE WITHOUT WRITTEN  
CONSENT FROM S. KARGER  
AG, BASEL IS A VIOLATION  
OF THE COPYRIGHT.

## Key Words

Recurrence · Protease inhibitors · Interferon-free regimens

## Abstract

Cirrhosis secondary to hepatitis C virus infection is the leading cause of liver transplantation in most countries. Hepatitis C has an accelerated course after transplantation, and for this reason graft and patient survival are decreased in comparison with other indications of liver transplantation. The development of direct-acting antivirals has been a major step in the management of hepatitis C and in a few years from now the infection will be eradicated with the combination of oral drugs with a good safety profile. This will likely allow prevention of hepatitis C recurrence in most cases. Meanwhile, management of hepatitis C virus infection still relies on the combination of interferon, ribavirin and the first-generation protease inhibitors telaprevir and boceprevir.

© 2014 S. Karger AG, Basel

## Pathogenesis of Hepatitis C Recurrence

Hepatitis C is accelerated in liver transplant recipients, compared to patients who are not immunosuppressed; 20–30% of recipients develop graft cirrhosis only 5 years after liver transplantation (LT) [1]. A small proportion of

patients (<5%) experience a rapid and aggressive form of recurrence (fibrosing cholestatic hepatitis). Overall, hepatitis C virus (HCV)-infected LT recipients have a shorter survival than recipients without HCV infection [2]. Blasco et al. [3] showed that the presence of portal hypertension (hepatic venous pressure gradient (HVPG)  $\geq 6$  mm Hg), or significant fibrosis (fibrosis score  $\geq 2$ ) 1 year after transplantation accurately identified patients at risk for clinical decompensation and graft loss, due to recurrent hepatitis C (rapid fibrosers), whereas patients with normal portal pressure and absent or mild fibrosis 1 year after LT had excellent outcomes (slow fibrosers). The latter supports the idea that the first months following LT are an important determinant of long-term outcome for patients with recurrent hepatitis C. The exact mechanisms leading to this rapid fibrosis progression in a significant proportion of patients are not known. Nevertheless, recurrent hepatitis C is characterized by hepatocellular damage, infiltration of the liver with inflammatory cells, and tissue remodeling that ultimately results in progressive fibrosis and cirrhosis [4]. Infiltrating inflammatory cells at the sites of liver injury secrete chemokines that stimulate hepatic stellate cells (HSCs), which proliferate and produce large amounts of extracellular matrix proteins. In patients with hepatitis C recurrence after LT, a number of mechanisms facilitate further activation of HSCs, such as production of reactive oxygen species (es-

KARGER

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/ddi

© 2014 S. Karger AG, Basel  
0257-2753/14/0000-0000\$39.50/0

Xavier Forns, MD  
Hospital Clinic  
Villarreal 170  
ES-08029 Barcelona (Spain)  
E-Mail xforns@clinic.ub.es

**Table 1.** Treatment of patients awaiting LT [5–8]

Reference (first author)	n	Child/MELD	Treatment	Median duration, months	VR/SVR, %
Forns [5]	30	93% A or B/-	INF + RIB	3	30/20
Everson [6]	124	7/11	LADR (INF + RIB)	6–12	46/30
Carrión [7]	51	88% A or B/12	PEG-INF + RIB	3	29/20
Everson [8]	63	7/12	LADR (PEG-INF + RIB)	4	59/25

VR (virological response) = undetectable HCV-RNA at time of liver transplantation; SVR = VR maintained at least 6 months following transplantation.

pecially with old donor age), production of pro-inflammatory cytokines (graft rejection, increased HCV replication, infection with cytomegalovirus) and persistent cholestasis (biliary complications). Indeed, some of these variables have been clearly related to a more aggressive course of hepatitis C following transplantation.

#### Treatment of Patients Awaiting Liver Transplantation

Patients with advanced cirrhosis and particularly those who are awaiting a LT are one of the most difficult to treat populations. The aim of antiviral treatment while on the waiting list is to achieve either a sustained virological response (SVR) or an on-treatment undetectable HCV-RNA at the time of transplantation to avoid HCV infection of the graft.

A few studies have shown that Peg-IFN + RBV treatment can prevent graft infection in patients who achieve viral clearance (undetectable HCV-RNA) during therapy before LT (table 1) [5–8]. As expected, response rates are mainly influenced by genotype (better results in non-G1 patients) and, in those patients who achieve viral clearance, it appears that duration of treatment may be relevant (>16 weeks of therapy is associated with prevention of graft infection after LT).

Forns et al. [5] and Carrión et al. [7] treated 81 patients in the waiting list with IFN/Peg-IFN + RBV. Antiviral therapy was started a few months before LT and continued until LT (median duration of ~12 weeks). Undetectable HCV-RNA was achieved in one third of treated individuals, but the overall response rate was only 20%, since infection recurred in some patients who had undetectable HCV-RNA at the time of transplantation. Everson et al. [6] evaluated the effectiveness, tolerability, and outcome of a low accelerating dose regimen (LADR) of

antiviral therapy (Peg-IFN + RBV) in 124 patients with advanced HCV-related cirrhosis awaiting LT. Overall, 24% of patients remained HCV-RNA-negative following LT; 63% of them were infected with non-1 genotypes (2 or 3). More recently a US multicentric, randomized, controlled study assessed the efficacy and safety of pretransplant Peg-IFN $\alpha_{2b}$  + RBV for prevention of post-transplant HCV recurrence [8]. Patients with HCV genotypes 1/4/6 (n = 44/2/1) were randomized 2:1 to treatment (n = 31) or untreated control (n = 16); all HCV G2/3 (n = 32) were assigned to treatment. Overall, 25% of treated patients achieved SVR (maintained 12 weeks after LT). The rate of relapse in patients who achieved on treatment response was surprisingly high in this study, though the use of a less sensitive assay to detect HCV-RNA in some centers may explain the differences with previous studies. As stated above, the only variable clearly related to permanent viral clearance was the duration of therapy (>16 weeks).

Treatment in this setting has several limitations. Firstly, a significant proportion of patients in the waiting list have absolute contraindications to undergo interferon-based therapy (i.e. advanced liver failure, cytopenias, renal failure) [1]. Secondly, it is not uncommon that patients awaiting LT have already undergone one or more courses of Peg-IFN + RBV: in case of previous null response or partial response, it is obvious that, unless boceprevir or telaprevir are included in the regimen (see below), retreatment of these patients is not indicated. Finally, safety is an issue when treating patients with advanced liver disease. Carrión et al. [7] analyzed in a case-control study the outcomes of 51 patients undergoing antiviral treatment while awaiting LT (compared to 51 untreated controls that were matched by MELD, Child-Pugh and time on the waiting list). The treated group showed a significantly higher incidence of bacterial infections (mainly Gram-negative spontaneous bac-

teremia and spontaneous bacterial peritonitis) when compared to the untreated control group. Infections (a few of them with fatal outcomes) occurred almost exclusively in patients with advanced liver disease (Child B and C). Similar results were recently reported by Everson et al. [8] and indeed, both studies support the use of prophylactic norfloxacin in Child B patients who will undergo interferon-based therapy and clearly dissuade the attending physician from treating patients with Child-Pugh C cirrhosis.

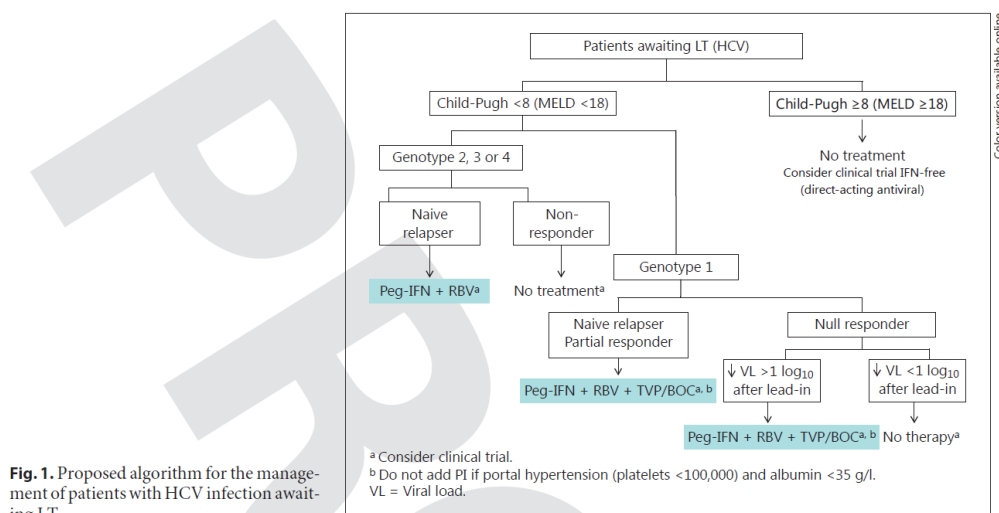
The recent approval of the first protease inhibitors (PIs) boceprevir and telaprevir has been a major step forward in the treatment of chronic hepatitis C in genotype-1-infected patients. The SVR rates increase by nearly 30% with triple therapy as compared to Peg-IFN + RBV in naive genotype-1 patients and by 25–60% in treatment-experienced genotype-1 patients (depending on previous treatment responses) [9–13]. Unfortunately, response rates are still significantly reduced in cirrhotic patients, both in naive and previously treated populations. The most disappointing results of the registration trials using first-generation PIs were probably obtained in cirrhotic patients who were previous null responders. Indeed, results from the REALIZE trial [13], which included a significant proportion of patients with advanced disease (F3/F4), showed SVR rates below 15% in this particular group of patients.

In addition to the disappointing efficacy results, PI-based regimens in compensated cirrhotic patients may be associated with serious adverse events, such as severe infection, clinical decompensation and even death. These important side effects were not seen in the registration trials since patients included in these studies were mostly very well compensated cirrhotics without significant portal hypertension (low platelet count was an exclusion criteria). Data from studies assessing the safety and efficacy of triple therapy in real life including patients with more advanced liver disease have been presented recently in several meetings. The largest series so far is the French CUPIC cohort [14] which includes nearly 500 HCV genotype-1 treatment-experienced compensated cirrhotics (relapsers and partial responders). Most patients were Child-Pugh A and the mean MELD score was 8; varices were present in around 35% and the mean platelet values were 150,000 (though with a wide range). Up-to-date SVR 12-week reported rates are 40 and 41% for telaprevir and boceprevir-based treatment, respectively. As stated above, the rates of serious adverse events were 54 and 51% with telaprevir-based and boceprevir-based therapy, respectively. Furthermore, infections were reported as an

important complication (4–9%) as well as hepatic decompensation (5%). It is noteworthy that the type of infections reported in the CUPIC cohort (and other large cohorts) did not follow the usual profile expected in cirrhotic patients (spontaneous bacteremia, spontaneous bacterial peritonitis or urinary infection caused by Gram-negative bacteria). In contrast, infections of the respiratory tract or sepsis caused by Gram-positive bacteria or other pathogens were frequently reported (some of them resulting in fatal outcome). The main predictive factors of severe complications (severe infections, clinical decompensation or death) were a low platelet count ( $<100,000/\text{mm}^3$ ) and low albumin levels ( $<35 \text{ g/l}$ ). Importantly, the odds ratio for severe complications was 3.11 in patients with low platelet counts, 6.33 in patients with albumin  $<35 \text{ g/l}$ , and the combination of both allows the definition of a subgroup of patients with a risk of  $>40\%$  to develop severe complications. As expected, anemia was a very frequent complication and blood transfusions were necessary in around 15% of treated individuals.

To date, data on triple therapy in HCV-infected patients awaiting LT are limited, but the French CUPIC cohort study suggests that the use of telaprevir and boceprevir should be restricted to G1-infected patients with very well compensated cirrhosis who do not have significant portal hypertension (HVPG  $<10 \text{ mm Hg}$ ). Thus, only patients in whom the indication of LT is hepatocellular carcinoma are potential candidates for LT. Previous relapsers or partial responders have greater probabilities of achieving a virological response; in previous null responders a lead-in phase should facilitate the decision to add a PI or interrupt treatment. In order to avoid the appearance of viral resistant strains (that could hamper future treatments after transplantation) it is very important to use the stopping rules in patients who undergo triple therapy while awaiting LT. As mentioned above, there is a clear relationship between a low platelet count/low albumin with the risk of severe adverse events and thus, triple therapy should not be indicated in Child B patients. An algorithm summarizing the management of hepatitis C in patients awaiting LT is shown in figure 1.

In the near future, more potent drugs and better tolerated regimens will become available. A number of new inhibitors of the HCV life cycle, including IFN-based and IFN-sparing regimens, are currently under investigation and they are expected to show several advantages over the first-generation PIs, including better safety and tolerability, especially in cirrhotic patients. Furthermore, combinations of some of these drugs have a higher barrier to resis-



**Fig. 1.** Proposed algorithm for the management of patients with HCV infection awaiting LT.

tance, have pan-genotypic activity and can be given for shorter periods of time. Overall, it becomes clear that in the next few years we will be able to treat most of our cirrhotic patients with safer and more potent drugs than those used currently. Nevertheless, well-designed studies including large cohort of cirrhotics are still necessary to confirm if we will indeed be able to eradicate hepatitis C in the majority of these patients. It is likely that the results of these studies will become available during 2014 and 2015.

#### Treatment of HCV Recurrence after Liver Transplantation

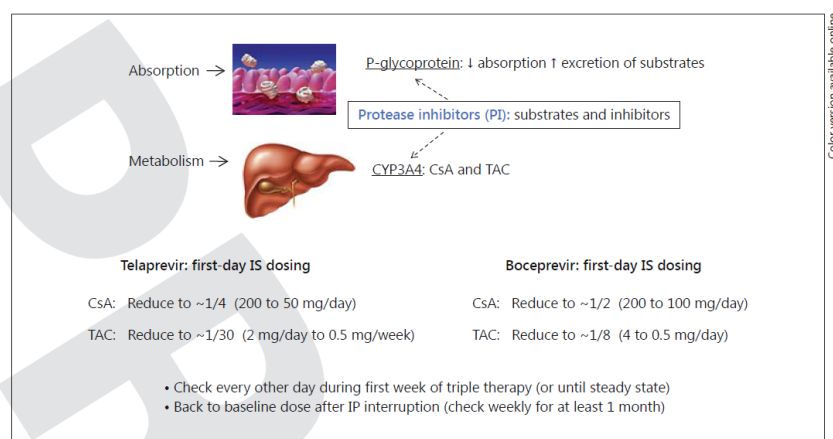
The cornerstone in the management of HCV patients after LT is correct follow-up of liver fibrosis across time. Assessment of hepatitis C severity after LT can be performed with invasive and non-invasive methods. It is well established that the presence of significant fibrosis in the graft (F ≥ 2, METAVIR) or portal hypertension (HVPG ≥ 6) 1 year after LT identifies patients with aggressive hepatitis C recurrence. These patients ('rapid fibrosers') have a higher risk of graft loss than patients with lower stages of fibrosis and normal portal pressure at the same time point ('slow fibrosers'), which have usually very good outcomes. Non-invasive methods such as liver stiffness mea-

surements have shown excellent correlation with histological and hemodynamic results, avoiding a number of liver biopsies [15, 16]. The early identification of patients at risk of progression is important to indicate antiviral therapies, as SVR after LT is known to reverse the fibrotic process and to have an impact on graft and patient survival [1, 17].

#### Standard Combined Therapy (Peg-IFN + RBV) after LT

The most common approach to treat hepatitis C after LT has been to start Peg-IFN + RBV once histological damage (especially fibrosis) is confirmed in the graft (months or even years after LT) [1]. Fibrosis F2 or a transient elastography >8.7 kPa identify patients who will benefit from viral eradication. Overall SVR rates with combined therapy are low, ranging between 30 and 40% across different series, which have been combined thereafter in three systematic reviews [18, 19]. These modest virological results are mainly explained by high rates of treatment discontinuation (20–38%), dose reductions (66–73%) and poor tolerance or adverse events. LT recipients are particularly prone to the hematological toxicity (particularly anemia). RBV dose reductions and the use of EPO are very frequent (75–80%) in this setting. The risk of rejection is small and has been reported to occur in ~5% of treated patients.





**Fig. 2.** Management of hepatitis C after LT. CsA- and TAC-proposed adjustments when using PIs.

Despite these results, the positive impact of SVR on survival is evident. Some years ago, Carrión et al. [20] also demonstrated the positive impact of SVR on HVPg when performed before and after antiviral treatment: portal pressure decreased or stabilized in responders compared to non-responders, in whom HVPg increased rapidly over time. More importantly, patients achieving SVR after LT have better survival curves compared to non-responders, as shown by Berenguer et al. [17].

#### Triple Therapy in the LT Setting

Regarding triple therapy with PIs in the post-LT setting, only preliminary data have been presented so far. Results in two large series of patients were presented in the last International Liver Congress. Coilly et al. [21] showed end-of-treatment data from a French multicenter cohort including 98 G1-infected LT recipients treated with triple therapy for 48 weeks. Most patients had advanced fibrosis or cirrhosis and a few of them fibrosing cholestatic hepatitis. Boceprevir was added to Peg-IFN and RBV in 42% of patients ( $n = 41$ ), while telaprevir was used in the remaining 58% ( $n = 57$ ). Immunosuppressive therapy was well balanced between cyclosporine (CsA) and tacrolimus (TAC) (50%). Up to one third of the cohort was infected with genotype 1a and 30% of patients were previous non-responders to standard combined therapy after LT. On-treatment responses (week 12) were 83% for patients receiving boceprevir and 61% of those

treated with telaprevir. End-of-treatment (week 48) responses were only available in a small number of individuals: 14 out of the 17 patients (82%) for boceprevir-based treatment and 6 out of 16 (38%) for those treated with telaprevir. One of the major concerns in the study was the high rate of treatment discontinuation (51% in the telaprevir group, 34% in boceprevir group) mainly due to the development of severe adverse events (42%). Some of these serious adverse events had fatal outcomes ( $n = 6$ ) and were mostly explained by sepsis ( $n = 5$ ).

Data from a multicentric US cohort (CRUSH) were also presented at the International Liver Congress (2013) by Verna et al. [22]. The study included 112 patients who were mainly treated with a telaprevir-based regimen (90%). Treatment with the PI was preceded by a lead-in phase (Peg-IFN + RBV), in most cases longer than 4 weeks. 55% of patients were infected with G1a, and half of the patients (48%) were previous non-responders to a previous course of Peg-IFN + RBV after LT. Up to 84% of patients showed significant fibrosis ( $F \geq 2$ ) in the liver biopsy before treatment, and the cohort included up to 10% of cirrhotic patients and 11% of individuals with fibrosing cholestatic hepatitis. Immunosuppressive therapy was CsA-based in 65% of patients and 35% were under TAC. At week 12, 78/93 (84%) had undetectable HCV-RNA; 58/86 (67%) had undetectable viremia by the end of therapy, and 28/43 (65%) remained HCV-RNA-negative 4 weeks after treatment interruption. As in the previous co-

hort, the rate of adverse events was high and 21% of patients required hospitalization. One third of patients required Peg-IFN dose reductions and 80% RBV dose reductions. EPO was used in nearly 80% of treated patients and half of individuals required blood transfusion.

Drug-drug interactions have become a challenge for transplant hepatologists who use PIs. It is well known that CYP3A4 isoenzymes are the most abundant in the liver and are involved in the metabolism of the majority of drugs. First-generation PIs (telaprevir, boceprevir) are not only substrates but also inhibitors of this system (as well as P-glycoprotein transporter), thus strongly interacting with many drugs. CsA and TAC are substrates of CYP3A. Taking into account their narrow therapeutic range, dose adjustments are crucial and require very close monitoring when combined with PIs. In a recent study in healthy volunteers, boceprevir has been shown to increase the area under the curve of CsA and TAC by 2.7 and 17, respectively [23]. In another study, the concomitant administration of immunosuppressive therapy with telaprevir in healthy volunteers increased CsA and TAC exposures approximately 4.6- and 70-fold, respectively [24]. These data, along with the experience accumulated by several groups, has derived in some general recommendations when indicating triple therapy in HCV-infected transplant patients (fig. 2).

#### *New Direct-Acting Antivirals and Interferon-Free Regimens after LT*

There are only a few isolated reports of the use of interferon-free regimens in the LT setting. Fontana et al. [25] showed for the first time the success of combined treatment with daclatasvir (a potent oral NS5A replication complex inhibitor) and sofosbuvir (a potent oral nucleotide polymerase inhibitor) for 24 weeks in an LT recipient suffering from a severe hepatitis C recurrence 8 months after LT. The patient achieved SVR.

Fortunately, several clinical trials using oral direct-acting antivirals are currently ongoing or recruiting patients in HCV-infected LT recipients. The current approach to the treatment of HCV-infected patients in the setting of LT will rapidly change in the next few years. It is likely that we will be able to prevent most cases of hepatitis C recurrence by treating HCV infection before transplantation. As occurred with hepatitis B, hepatitis C-related cirrhosis will show excellent results after LT.

#### **Disclosure Statement**

X.F. has received unrestricted grant support from MSD and Jansen and has acted as advisor for Jansen, MSD and Gilead.

#### **References**

- Crespo G, Marino Z, Navasa M, Forns X: Viral hepatitis in liver transplantation. *Gastroenterology* 2012;142:1373–1383.
- Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR: The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122:889–896.
- Blasco A, Forns X, Carrión JA, Garcia-Pagan JC, Gilabert R, Rimola A, Miquel R, et al: Hepatic venous pressure gradient identifies patients at risk of severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2006; 43:492–499.
- Berenguer M, Schuppan D: Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: mechanisms, assessment and treatment. *J Hepatol* 2013;58:1028–1041.
- Forns X, Garcia-Retortillo M, Serrano T, Feliu A, Suarez F, de la Mata M, Garcia-Valdecasas JC, et al: Antiviral therapy of patients with decompensated cirrhosis to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *J Hepatol* 2003;39:389–396.
- Everson GT, Trotter J, Forman L, Kugelmas M, Halprin A, Fey B, Ray C: Treatment of advanced hepatitis C with a low accelerating dosage regimen of antiviral therapy. *Hepatology* 2005;42:255–262.
- Carrión JA, Martínez-Bauer E, Crespo G, Ramirez S, Perez-del-Pulgar S, Garcia-Valdecasas JC, Navasa M, et al: Antiviral therapy increases the risk of bacterial infections in HCV-infected cirrhotic patients awaiting liver. *J Hepatol* 2009;50:719–728.
- Everson GT, Terrault NA, Lok AS, Rodrigo del R, Brown RS Jr, Saab S, Shiffman ML, et al: A randomized controlled trial of pretransplant antiviral therapy to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 2013;57:1752–1762.
- Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, et al: Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364: 1195–1206.
- Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, et al: Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011;364:2405–2416.
- Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH, Nelson DR, Sulkowski MS, Everson GT, Fried MW, et al: Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011;365:1014–1024.
- Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, et al: Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364: 1207–1217.
- Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, et al: Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011;364:2417–2428.
- Hezode C, Fontaine H, Dorival C, Larrey D, Zoulim F, Canva V, de Ledinghen V, et al: Triple therapy in treatment-experienced patients with HCV-cirrhosis in a multicentre cohort of the French Early Access Programme (ANRS CO20-CUPIC) – NCT01514890. *J Hepatol* 2013;59:434–441.

- 15 Carrión JA, Navasa M, Bosch J, Bruguera M, Gilibert R, Forns X: Transient elastography for diagnosis of advanced fibrosis and portal hypertension in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:1791–1798.
- 16 Carrión JA, Torres F, Crespo G, Miquel R, García-Valdecasas JC, Navasa M, Forns X: Liver stiffness identifies two different patterns of fibrosis progression in patients with hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2010;51:23–34.
- 17 Berenguer M, Palau A, Aguilera V, Rayon JM, Juan FS, Prieto M: Clinical benefits of antiviral therapy in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:679–687.
- 18 Wang CS, Ko HH, Yoshida EM, Marra CA, Richardson K: Interferon-based combination anti-viral therapy for hepatitis C virus after liver transplantation: a review and quantitative analysis. *Am J Transplant* 2006;6:1586–1599.
- 19 Xirouchakis E, Triantos C, Manousou P, Sigalas A, Calvaruso V, Corbani A, Leandro G, et al: Pegylated-interferon and ribavirin in liver transplant candidates and recipients with HCV cirrhosis: systematic review and meta-analysis of prospective controlled studies. *J Viral Hepat* 2008;15:699–709.
- 20 Carrión JA, Navasa M, García-Retortillo M, García-Pagan JC, Crespo G, Bruguera M, Bosch J, et al: Efficacy of antiviral therapy on hepatitis C recurrence after liver transplantation: a randomized controlled study. *Gastroenterology* 2007;132:1746–1756.
- 21 Coilly A, Dumortier J, Botta-Fridlund D, Latournerie M, Leroy V, Pageaux G, Giostra E, et al: End of treatment response after protease inhibitor-based therapy for hepatitis C recurrence after Liver Transplantation: A Multi-centric European Experience. *J Hepatol* 2013; 58(suppl 1):S572–S573.
- 22 Verna E, Burton J, O'Leary J, Lai J, Saxena V, Dodge J, Everson G, et al: A multicenter study of protease inhibitor-triple therapy in HCV-infected liver transplant recipients: report from the CRUSH-C group. *J Hepatol* 2013; 58(suppl 1):S10–S11.
- 23 Hulskotte E, Gupta S, Xuan F, van Zutven M, O'Mara E, Feng HP, Wagner J, et al: Pharmacokinetic interaction between the hepatitis C virus protease inhibitor boceprevir and cyclosporine and tacrolimus in healthy volunteers. *Hepatology* 2012;56:1622–1630.
- 24 Garg V, van Heeswijk R, Lee JE, Alves K, Nadkarni P, Luo X: Effect of telaprevir on the pharmacokinetics of cyclosporine and tacrolimus. *Hepatology* 2011;54:20–27.
- 25 Fontana R, Hughes E, Bifano M, Appelman H, Dimitrova D, Hinds R, Symonds W: Sofosbuvir and daclatasvir combination therapy in a liver transplant recipient with severe recurrent cholestatic hepatitis C. *Am J Transplant* 2013;13:1601–1605.